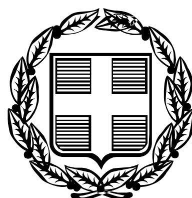


ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ

ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

ΤΕΥΧΟΣ ΠΡΩΤΟ **Αρ. Φύλλου 137**

22 Ιουνίου 2007

ΠΡΟΕΔΡΙΚΟ ΔΙΑΤΑΓΜΑ ΥΠ' ΑΡΙΘΜ. 108

Τροποποίηση των Παραρτημάτων II, III, IV, V, VI και VII του π.δ. 255/2000 (Α΄ 214) «Μέτρα για τον έλεγχο του παθογόνου βακτηρίου των γεωμήλων και της ντομάτας Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 98/57/ΕΚ του Συμβουλίου.», σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 2006/63/ΕΚ της Επιτροπής και συμπλήρωση διατάξεων του διατάγματος αυτού.

Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

Έχοντας υπόψη:

1. Τις διατάξεις

α) Του άρθρου 1 παρ. 1, 2 και 3 του ν.1338/1983 «Εφαρμογή του Κοινοτικού Δικαίου» (Α΄ 34) όπως η παρ. 1 έχει τροποποιηθεί με τη διάταξη του άρθρου 6 παρ. 1 του ν.1440/1984 «Συμμετοχή της Ελλάδος στο κεφάλαιο, στα αποθεματικά και στις προβλέψεις της Ευρωπαϊκής Τράπεζας Επενδύσεων, στο κεφάλαιο της Ευρωπαϊκής Κοινότητος, Άνθρακος και Χάλυβος και του Οργανισμού Εφοδιασμού EURATOM» (Α΄ 70) και του άρθρου 3 του ιδίου ν. 1338/1983, όπως αυτό έχει αντικατασταθεί με το άρθρο 65 του ν. 1892/90 (Α΄ 101).

β) Του άρθρου 4 του ν.2147/1952 (Α΄ 155) «Περί προλήψεως και καταστολής των ασθενειών και εχθρών των φυτών και περί οργανώσεως της Φυτοπαθολογικής Υπηρεσίας».

γ) Του άρθρου 90 του Κώδικα Νομοθεσίας για την Κυβέρνηση και τα Κυβερνητικά όργανα που τέθηκε σε ισχύ με το άρθρο του υπ΄ αριθμ. 63/2005 προεδρικού διατάγματος (Α΄ 98).

2. Την υπ' αριθμ. Υ 132/11.10.2004 (Β΄ 1533) κοινή απόφαση του Πρωθυπουργού και του Υπουργού Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων «Ανάθεση αρμοδιοτήτων στον Υφυπουργό Αγροτικής Ανάπτυξης Αλέξανδρο Κοντό.»

3. Το γεγονός ότι από τις διατάξεις του παρόντος διατάγματος δεν προκαλείται δαπάνη σε βάρος του Κρατικού Προϋπολογισμού.

4. Την υπ' αριθμ. 78/2007 γνωμοδότηση του Συμβουλίου της Επικρατείας μετά από πρόταση του Υπουργού Οικονομίας και Οικονομικών και του Υφυπουργού Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, αποφασίζουμε:

Άρθρο 1
Σκοπός

Με το παρόν προεδρικό διάταγμα αντικαθίστανται τα Παραρτήματα II, III, IV, V, VI και VII του π.δ. 255/2000 (Α΄ 214), σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 2006/63/ΕΚ (L 206/36, 27.7.2006) της Επιτροπής «για την τροποποίηση των παραρτημάτων II έως VII της Οδηγίας 98/57/ΕΚ του Συμβουλίου για τον έλεγχο του Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al.» και συμπληρώνονται διατάξεις του διατάγματος αυτού.

Άρθρο 2
(άρθρο 1 Οδηγίας 2006/63/ΕΚ)

Τα Παραρτήματα II, III, IV, V, VI και VII του άρθρου 11 του π.δ. 255/2000 (Α΄ 214) αντικαθίστανται αντίστοιχα ως εξής :

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II
ΣΧΗΜΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Στο παρόν σχήμα περιγράφονται οι διάφορες διαδικασίες για:

i) τη διάγνωση της καστανής σήψης σε κονδύλους πατάτας και της βακτηριακής μάρανσης σε φυτά πατάτας και τομάτας καθώς και σε άλλα φυτά ξενιστές·

ii) την ανίχνευση του Ralstonia solanacearum σε δείγματα κονδύλων πατάτας, φυτών πατάτας, τομάτας και άλλων φυτών ξενιστών, στο νερό και το έδαφος·

iii) την ταυτοποίηση του Ralstonia solanacearum (R. solanacearum).

ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Στα Προσαρτήματα παρέχονται βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα σχετικά με τις διάφορες μεθόδους, επικυρωμένα (validated) αντιδραστήρια και λεπτομέρειες για την προετοιμασία των υλικών δοκιμής και μαρτύρων. Στο Προσάρτημα 1 παρατίθεται κατάλογος των εργαστηρίων που συμμετείχαν στη βελτιστοποίηση και επικύρωση των πρωτοκόλλων.

Λόγω του ότι τα πρωτόκολλα αφορούν την ανίχνευση ενός οργανισμού καραντίνας και περιλαμβάνουν τη χρήση βιώσιμων καλλιεργειών του R. solanacearum ως υλικών μαρτύρων, είναι απαραίτητο να εφαρμοσθούν οι διαδικασίες υπό τις κατάλληλες συνθήκες καραντίνας, με επαρκείς εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων και υπό την προϋπόθεση προηγούμενης χορήγησης των κατάλληλων αδειών από τις αρμόδιες αρχές που είναι υπεύθυνες για θέματα καραντίνας φυτών.

Οι παράμετροι που καθορίζουν τη διεξαγωγή των δοκιμών πρέπει να εξασφαλίζουν σταθερή και αναπαραγώγιμη ανίχνευση των επιπέδων του R. solanacearum στα καθορισθέντα όρια των επιλεγμένων μεθόδων.

Η ακριβής παρασκευή των θετικών μαρτύρων είναι επιτακτική.

Η διενέργεια δοκιμών σύμφωνα με τα απαιτούμενα όρια προϋποθέτει επίσης την εξασφάλιση ορθών παραμέτρων, συντήρηση και βαθμονόμηση του εξοπλισμού, την προσεκτική μεταχείριση και συντήρηση των αντιδραστηρίων καθώς και τη λήψη όλων των απαραίτητων μέτρων για την αποφυγή μόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων, π.χ. το διαχωρισμό των θετικών μαρτύρων από τα ελεγχόμενα δείγματα. Είναι απαραίτητο να εφαρμόζονται πρότυπα ελέγχου της ποιότητας έτσι ώστε να αποφεύγονται διοικητικά και άλλα σφάλματα, ιδιαίτερα όσον αφορά την σήμανση και την τεκμηρίωση.

Η πιθανολογούμενη εμφάνιση του παθογόνου, όπως αυτή αναφέρεται στο άρθρο 4 παράγραφος 2 του π.δ. 255/2000 (Α΄ 214), σημαίνει την ύπαρξη θετικού αποτελέσματος των διαγνωστικών δοκιμών ή των δοκιμών διαλογής που διενεργήθηκαν επί δείγματος, όπως ορίζεται στα διαγράμματα ροής που παρατίθενται στη συνέχεια. Μία θετική πρώτη δοκιμή διαλογής (δοκιμή IF, PCR/FISH, εκλεκτική απομόνωση) πρέπει να επιβεβαιωθεί από δεύτερη δοκιμή διαλογής με βάση διαφορετική βιολογική αρχή.

Εάν η πρώτη δοκιμή διαλογής είναι θετική, η μόλυνση από το R. solanacearum θεωρείται πιθανή και πρέπει να πραγματοποιηθεί δεύτερη δοκιμή διαλογής. Εάν και η δεύτερη δοκιμή διαλογής είναι θετική, η υποψία μόλυνσης επιβεβαιώνεται (πιθανολογούμενη εμφάνιση του παθογόνου) και πρέπει να συνεχισθεί η πραγματοποίηση δοκιμών σύμφωνα με το σχήμα. Εάν η δεύτερη δοκιμή διαλογής είναι αρνητική, τότε θεωρείται ότι το δείγμα δεν έχει μολυνθεί από το R. solanacearum.

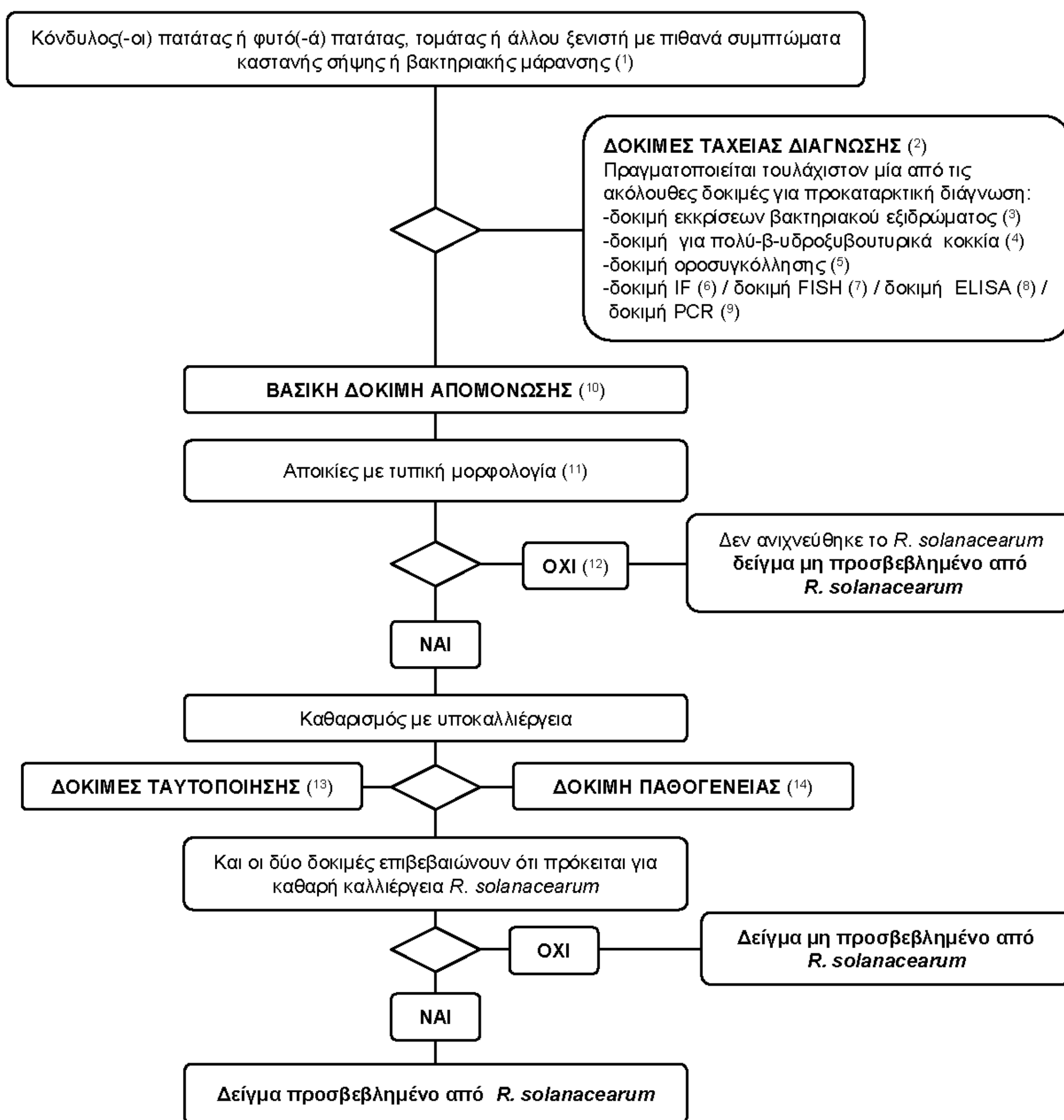
Η επιβεβαίωση της παρουσίας του οργανισμού, όπως αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 1 του π.δ. 255/2000 (Α΄ 214), σημαίνει την απομόνωση και ταυτοποίηση καθαρής καλλιέργειας του R. solanacearum και επιβεβαίωση της παθογένειας.

ΕΝΟΤΗΤΑ Ι

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ

1. Σχήμα ανίχνευσης για τη διάγνωση της καστανής σήψης και της βακτηριακής μάρανσης (Ralstonia solanacearum) σε κονδύλους πατάτας και φυτά πατάτας, τομάτας ή άλλα φυτά ξενιστές που παρουσιάζουν συμπτώματα καστανής σήψης ή βακτηριακής μάρανσης.

Η διαδικασία εξέτασης προορίζεται για κονδύλους και φυτά πατάτας που παρουσιάζουν τυπικά ή ύποπτα συμπτώματα της καστανής σήψης ή μαρασμού των φυτών. Η διαδικασία περιλαμβάνει μία δοκιμή ταχείας διαλογής, απομόνωση του παθογόνου αιτίου από μολυσμένο αγγειώδη ιστό σε (εκλεκτικά) υλικά και, σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, ταυτοποίηση της καλλιέργειας ως Ralstonia solanacearum.



(1) Για την περιγραφή των συμπτωμάτων βλέπε ενότητα II.1.

(2) Οι ταχείες διαγνωστικές δοκιμές διευκολύνουν την προκαταρκτική διάγνωση αλλά δεν είναι απόλυτα αναγκαίες. Η ύπαρξη αρνητικού αποτελέσματος δεν εγγυάται πάντοτε την απουσία του παθογόνου.

(3) Η δοκιμή εκκρίσεων για βακτηριακό εξίδρωμα από τον αγγειώδη ιστό του στελέχους περιγράφεται στην ενότητα VI.A.1.

(4) Η δοκιμή για πολυ-β-υδροξυβουτυρικά κοκκία σε βακτηριακά κύτταρα περιγράφεται στην ενότητα VI.A.2.

(5) Οι δοκιμές οροσυγκόλλησης σε βακτηριακό εξίδρωμα ή εκχυλίσματα από ιστούς που παρουσιάζουν συμπτώματα περιγράφονται στην ενότητα VI.A.3.

(6) Η δοκιμή IF σε αιώρημα βακτηριακής εξίδρωσης σε νερό ή σε εκχυλίσματα ιστών που παρουσιάζουν συμπτώματα περιγράφεται στην ενότητα VI.A.5.

(7) Η δοκιμή FISH σε αιώρημα βακτηριακής εξίδρωσης σε νερό ή σε εκχυλίσματα ιστών που παρουσιάζουν συμπτώματα περιγράφεται στην ενότητα VI.A.7.

(8) Η δοκιμή ELISA σε αιώρημα βακτηριακής εξίδρωσης σε νερό ή σε εκχυλίσματα ιστών που παρουσιάζουν συμπτώματα περιγράφεται στην ενότητα VI.A.8.

(9) Η δοκιμή PCR σε αιώρημα βακτηριακής εξίδρωσης σε νερό ή σε εκχυλίσματα ιστών που παρουσιάζουν συμπτώματα περιγράφεται στην ενότητα VI.A.6.

(10) Το παθογόνο συνήθως απομονώνεται εύκολα από φυτικό υλικό που παρουσιάζει συμπτώματα με τη διαδικασία αραιώσεων επί στερεού υποστρώματος (ενότητα II.3).

(11) Η τυπική μορφολογία των αποικιών περιγράφεται στην ενότητα II.3.δ.

(12) Σε προχωρημένα στάδια μόλυνσης, η καλλιέργεια είναι δυνατόν να αποτύχει λόγω ανταγωνισμού ή παρεμπόδισης από σαπροφυτικά βακτήρια. Εάν υπάρχουν τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας αλλά η δοκιμή απομόνωσης είναι αρνητική, τότε η διαδικασία απομόνωσης πρέπει να επαναληφθεί, κατά προτίμηση με εκλεκτική απομόνωση επί στερεού υποστρώματος.

(13) Η αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρών καλλιεργειών πιθανών απομονώσεων *R. solanacearum* επιτυγχάνεται με τη χρήση των δοκιμών που περιγράφονται στην ενότητα VI.B. Ο χαρακτηρισμός για ταξινομικά επίπεδα κάτω του είδους είναι προαιρετικός αλλά συνιστάται για κάθε νέα περίπτωση.

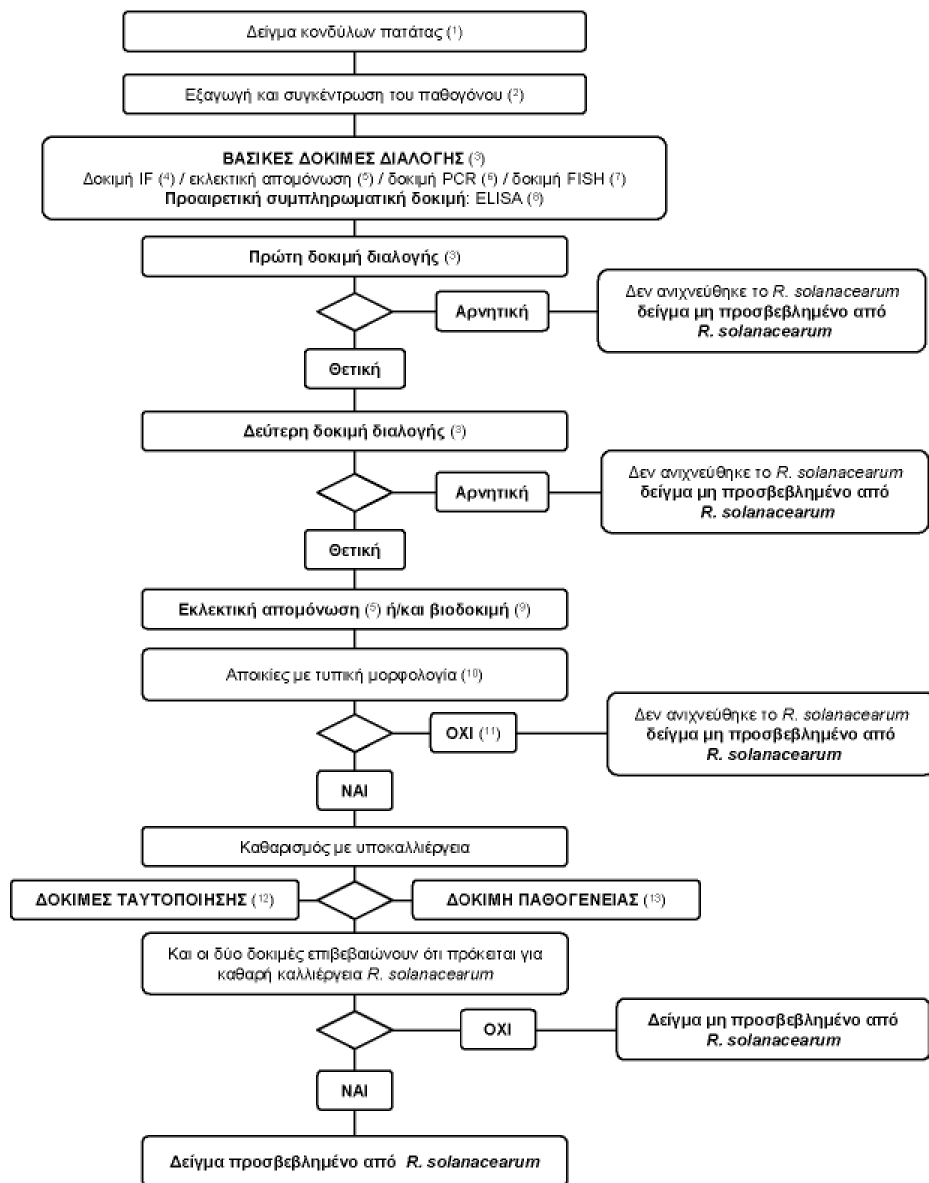
(14) Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα VI.Γ.

2. Σχήμα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του Ralstonia solanacearum σε δείγματα ασυμπτωματικών κονδύλων πατάτας

Αρχή:

Η διαδικασία εξέτασης αποσκοπεί στην ανίχνευση μολύνσεων σε λανθάνουσα μορφή σε κονδύλους πατάτας. Το θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον δύο δοκιμών διαλογής(3) που βασίζεται σε διαφορετικές βιολογικές αρχές, πρέπει να συμπληρώνεται με την απομόνωση του παθογόνου· ακολουθεί δε, στην περίπτωση απομόνωσης τυπικών αποικιών, επιβεβαίωση μιας καθαρής καλλιέργειας ως καλλιέργειας R. solanacearum. Το θετικό αποτέλεσμα μίας μόνον δοκιμής διαλογής δεν επαρκεί για να θεωρηθεί το δείγμα ύποπτο.

Οι δοκιμές διαλογής και οι δοκιμές απομόνωσης πρέπει να επιτρέπουν την ανίχνευση 103 έως 104 κυττάρων/ml αιωρήματος του ιζήματος, συμπεριλαμβανομένων ως θετικών μαρτύρων σε κάθε σειρά δοκιμών.



(1) Το πρότυπο μέγεθος δείγματος είναι 200 κόνδυλοι αν και η διαδικασία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί με μικρότερα δείγματα εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμοι 200 κόνδυλοι.

(2) Οι μέθοδοι εξαγωγής και συγκέντρωσης του παθογόνου περιγράφονται στην ενότητα III.1.1.

(3) Στην περίπτωση που δύο τουλάχιστον δοκιμές με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές είναι θετικές, πρέπει να διεξαχθεί απομόνωση και επιβεβαίωση. Πραγματοποιείται τουλάχιστον μία δοκιμή διαλογής. Στην περίπτωση που η εν λόγω δοκιμή είναι αρνητική, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Στην περίπτωση που η εν λόγω δοκιμή είναι θετική, απαιτείται η διενέργεια δεύτερης ή περισσοτέρων δοκιμών διαλογής με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί το πρώτο θετικό αποτέλεσμα. Εάν η δεύτερη ή άλλες δοκιμές είναι αρνητικές, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Δεν είναι απαραίτητες περαιτέρω δοκιμές.

(4) Η δοκιμή IF περιγράφεται στην ενότητα VI.A.5.

(5) Η δοκιμή εκλεκτικής απομόνωσης περιγράφεται στην ενότητα VI.A.4.

(6) Οι δοκιμές PCR περιγράφονται στην ενότητα VI.A.6.

(7) Η δοκιμή FISH περιγράφεται στην ενότητα VI.A.7.

(8) Οι δοκιμές ELISA περιγράφονται στην ενότητα VI.A.8.

(9) Η βιοδοκιμή περιγράφεται στην ενότητα VI.A.9.

(10) Η τυπική μορφολογία των αποικιών περιγράφεται στην ενότητα II.3.δ.

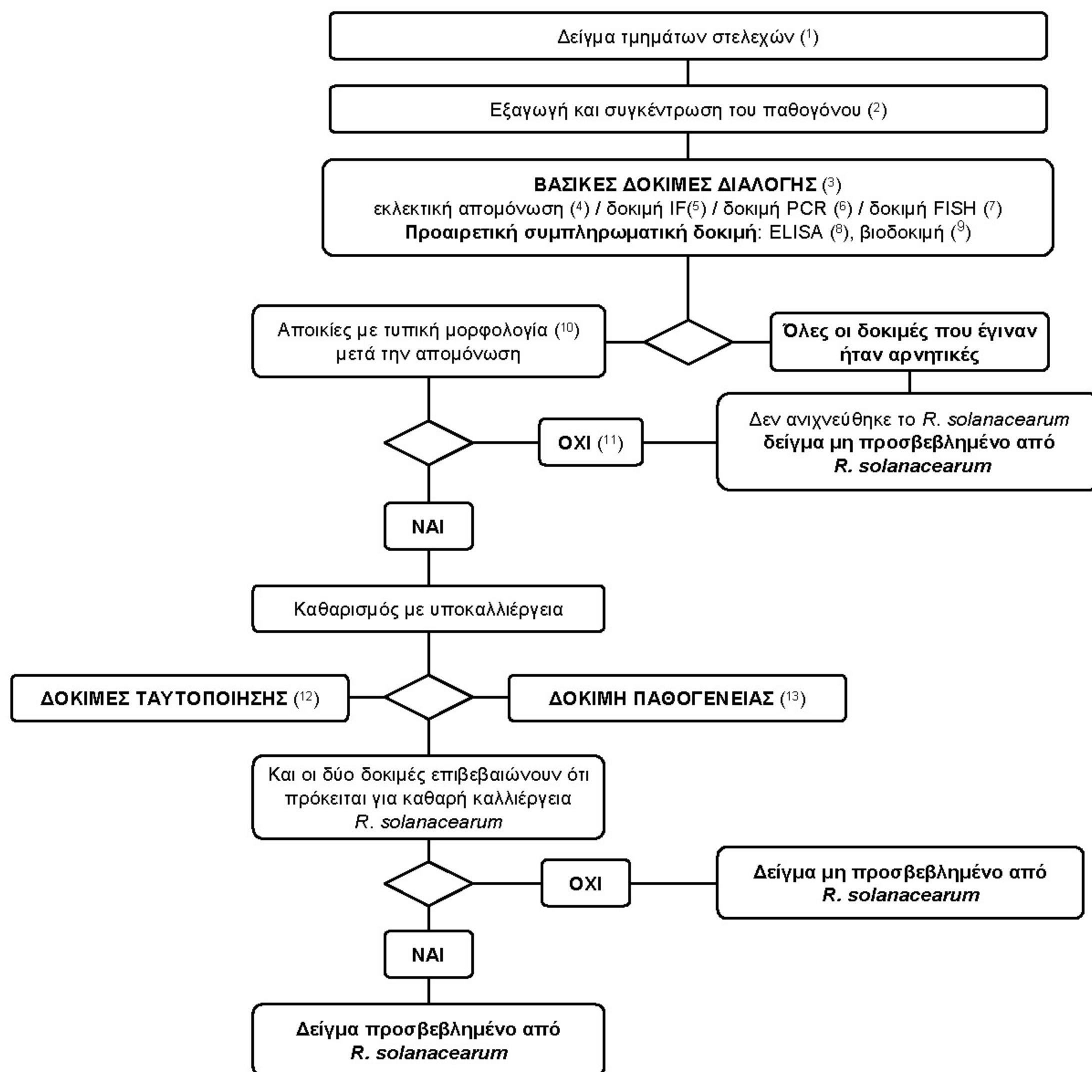
(11) Η καλλιέργεια ή οι βιοδοκιμές είναι δυνατόν να αποτύχουν λόγω ανταγωνισμού ή παρεμπόδισης από σαπροφυτικά βακτήρια. Εάν αποκτηθούν θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές διαλογής, αλλά τα αποτελέσματα των δοκιμών απομόνωσης είναι αρνητικά, πρέπει να επαναληφθούν οι δοκιμές απομόνωσης από το ίδιο ίζημα ή με τη λήψη πρόσθετου αγγειώδους ιστού κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου από κομμένους κονδύλους του ιδίου δείγματος και, εάν είναι απαραίτητο, να ελεγχθούν περαιτέρω δείγματα.

(12) Η αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρών καλλιεργειών πιθανών απομονώσεων του *R. solanacearum* επιτυγχάνεται με τη χρήση των δοκιμών που περιγράφονται στην ενότητα VI.B.

(13) **Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα VI.Γ.**



3. Σχήμα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του Ralstonia solanacearum σε δείγματα ασυμπτωματικών φυτών πατάτας, τομάτας ή άλλων φυτών ξενιστών



(1) Βλέπε ενότητα ΙΙΙ.2.1. για τα συνιστώμενα μεγέθη δειγμάτων.

(2) Οι μέθοδοι εξαγωγής και συγκέντρωσης του παθογόνου περιγράφονται στην ενότητα ΙΙΙ.2.1.

(3) Στην περίπτωση που δύο τουλάχιστον δοκιμές με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές είναι θετικές, πρέπει να διεξαχθεί απομόνωση και επιβεβαίωση. Πραγματοποιείται τουλάχιστον μία δοκιμή διαλογής. Στην περίπτωση που η εν λόγω δοκιμή είναι αρνητική, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Στην περίπτωση που η εν λόγω δοκιμή είναι θετική, απαιτείται η διενέργεια δεύτερης ή περισσοτέρων δοκιμών διαλογής με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί το πρώτο θετικό αποτέλεσμα. Εάν η δεύτερη ή άλλες δοκιμές είναι αρνητικές, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Δεν είναι απαραίτητες περαιτέρω δοκιμές.

(4) Η δοκιμή εκλεκτικής απομόνωσης περιγράφεται στην ενότητα VI.A.4.

(5) Η δοκιμή IF περιγράφεται στην ενότητα VI.A.5.

(6) Οι δοκιμές PCR περιγράφονται στην ενότητα VI.A.6.

(7) Η δοκιμή FISH περιγράφεται στην ενότητα VI.A.7.

(8) Οι δοκιμές ELISA περιγράφονται στην ενότητα VI.A.8.

(9) Η βιοδοκιμή περιγράφεται στην ενότητα VI.A.9.

(10) Η τυπική μορφολογία των αποικιών περιγράφεται στην ενότητα ΙΙ.3.δ.

(11) Η καλλιέργεια ή οι βιοδοκιμές είναι δυνατόν να αποτύχουν λόγω ανταγωνισμού ή παρεμπόδισης από σαπροφυτικά βακτήρια. Εάν αποκτηθούν θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές διαλογής αλλά τα αποτελέσματα των δοκιμών απομόνωσης είναι αρνητικά, πρέπει να επαναληφθούν οι δοκιμές απομόνωσης.

(12) Η αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρών πιθανών καλλιεργειών του *R. solanacearum* επιτυγχάνεται με τη χρήση των δοκιμών που περιγράφονται στην ενότητα VI.B.

(13) Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα VI.Γ.

Ενότητα ΙΙ

Λεπτομερείς μέθοδοι για την ανίχνευση του Ralstonia solanacearum σε κονδύλους πατάτας και σε φυτά πατάτας, τομάτας Ή άλλα φυτά ξενιστές που παρουσιάζουν συμπτώματα καστανησ σήψης ή βακτηριακής μάρανσης

1. Συμπτώματα (βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

1.1. Συμπτώματα στην πατάτα

Στο φυτό πατάτας. Το αρχικό στάδιο της μόλυνσης στον αγρό αναγνωρίζεται από τον μαρασμό των φύλλων προς την κορυφή του φυτού σε υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της ημέρας με ανάληψη κατά τη διάρκεια της νύχτας. Στα αρχικά στάδια της μάρανσης τα φύλλα παραμένουν πράσινα, αλλά αργότερα αναπτύσσεται κίτρινη και καστανή νέκρωση. Παρουσιάζεται επίσης επιναστία. Η μάρανση ενός βλαστού ή ολόκληρων των φυτών σύντομα καθίσταται μη αναστρέψιμη και έχει ως αποτέλεσμα την κατάρρευση και το θάνατο του φυτού. Ο αγγειώδης ιστός σε εγκαρσίως κομμένα στελέχη από μαραμένα φυτά συνήθως εμφανίζεται καστανός, και μία γαλακτώδης βακτηριακή εξίδρωση εκρέει από την κομμένη επιφάνεια, ή μπορεί να εξέλθει με συμπίεση. Όταν ένα κομμένο στέλεχος τοποθετηθεί κατακόρυφα μέσα σε νερό, από τις αγγειώδεις δέσμες εκρέουν κλωστές γλοιώδους υγρού.

Στον κόνδυλο πατάτας. Οι κόνδυλοι πρέπει να κόβονται εγκαρσίως κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου είτε κατά μήκος πάνω από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου. Το αρχικό στάδιο της ασθένειας αναγνωρίζεται από έναν υαλώδη κίτρινο προς ανοικτό καστανό, μεταχρωματισμό του αγγειώδους δακτυλίου από τον οποίο εκρέει αυθόρμητα μετά λίγα λεπτά ένα υπόλευκο βακτηριακό εξίδρωμα. Αργότερα, ο αγγειακός μεταχρωματισμός καθίσταται εντονότερα καστανός και η νέκρωση μπορεί να επεκταθεί στον παρεγχυματικό ιστό. Σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας, η μόλυνση εκδηλώνεται εξωτερικά από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου και τους οφθαλμούς από τους οποίους μπορεί να εκρέει βακτηριακό γλοιώδες έκκριμα προκαλώντας την προσκόλληση σωματιδίων του εδάφους. Ενδέχεται να εμφανίζονται στην επιδερμίδα ερυθροκάστανες, ελαφρώς βυθισμένες κηλίδες λόγω της εσωτερικής κατάρρευσης των αγγειωδών ιστών. Η δευτερογενής ανάπτυξη μαλακών σήψεων από μύκητες ή βακτήρια είναι συχνή στα προχωρημένα στάδια της ασθένειας.

1.2. Συμπτώματα στην τομάτα

Στο φυτό τομάτας. Το πρώτο ορατό σύμπτωμα είναι η έλλειψη σπαργής στα νεαρά φύλλα. Υπό περιβαλλοντικές συνθήκες που είναι ευνοϊκές για το παθογόνο (θερμοκρασία εδάφους περίπου 25°C, ατμόσφαιρα κορεσμένη σε υγρασία), μέσα σε λίγες μέρες εμφανίζεται επιναστία και μαρασμός της μιας πλευράς ή και ολόκληρου του φυτού, στη συνέχεια δε πλήρης κατάρρευση του φυτού. Υπό λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες (θερμοκρασία εδάφους κάτω των 21°C), ο μαρασμός είναι λιγότερος αλλά μπορεί να αναπτύσσεται μεγάλος αριθμός τυχαίων ριζών επί του στελέχους. Είναι δυνατόν να παρατηρούνται βρεγμένες λωρίδες από τη βάση του στελέχους πράγμα που αποτελεί απόδειξη της νέκρωσης του αγγειακού συστήματος. Σε εγκάρσιες τομές του στελέχους, από τους καστανόχρωμα μεταχρωματισμένους αγγειακούς ιστούς εκρέει λευκή ή υποκίτρινη βακτηριακή εξίδρωση.

1.3. Συμπτώματα σε άλλους ξενιστές

Φυτά Solanum dulcamara και S. nigrum. Σε φυσικές συνθήκες, σπανίως παρατηρούνται συμπτώματα μάρανσης στα εν λόγω ζιζάνια-ξενιστές, εκτός εάν οι θερμοκρασίες του εδάφους υπερβαίνουν τους 25°C ή τα επίπεδα του μολύσματος είναι εξαιρετικά υψηλά (π.χ. για το S. nigrum που αναπτύσσεται δίπλα σε προσβεβλημένα φυτά πατάτας ή τομάτας). Όταν εμφανίζεται μάρανση, τα συμπτώματα που παρατηρούνται είναι όμοια με αυτά που περιγράφονται για την τομάτα. Φυτά S. dulcamara που δεν έχουν υποστεί μαρασμό και τα οποία αναπτύσσονται με τα στελέχη και τις ρίζες σε νερό, ενδέχεται να εμφανίζουν απαλό καστανό εσωτερικό μεταχρωματισμό του αγγειώδους ιστού σε εγκάρσια τομή της βάσης του στελέχους ή τμημάτων του στελέχους κάτω από το νερό. Ενδέχεται να εκρέει βακτηριακή εξίδρωση από κομμένους αγγειώδεις ιστούς ή να εκρέουν κλωστές γλοιώδους υγρού εάν το κομμένο στέλεχος τοποθετηθεί κατακόρυφα μέσα σε νερό, ακόμη και εάν δεν υπάρχουν συμπτώματα μάρανσης.

2. Δοκιμές ταχείας διαλογής

Οι δοκιμές ταχείας διαλογής είναι δυνατόν να διευκολύνουν την προκαταρκτική διάγνωση αλλά δεν είναι απόλυτα αναγκαίες. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες επικυρωμένες δοκιμές:

2.1. Δοκιμή εκκρίσεων από το στέλεχος

(Βλέπε ενότητα VI.A.1.)

2.2. Ανίχνευση πολυ-β-υδροξυβουτυρικών (PHB) κοκκίων

Τα χαρακτηριστικά κοκκία PHB στα κύτταρα του R. solanacearum καθίστανται ορατά διά χρώσεως λεπτών επιχρισμάτων (που έχουν προσηλωθεί με θερμότητα) βακτηριακού εξιδρώματος από προσβεβλημένο ιστό σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου με Nile Blue A ή Sudan Black (βλέπε ενότητα VI.A.2.).

2.3. Δοκιμές οροσυγκόλλησης

(Βλέπε ενότητα VI.A.3.)

2.4. Άλλες δοκιμές

Στις περαιτέρω κατάλληλες δοκιμές ταχείας διαλογής συμπεριλαμβάνεται η δοκιμή IF (βλέπε ενότητα VI.A.5.), η δοκιμή FISH (βλέπε ενότητα VI.A.7.), οι δοκιμές ELISA (βλέπε ενότητα VI.A.8.) και οι δοκιμές PCR (βλέπε ενότητα VI.A.6).

3. Διαδικασία απομόνωσης

α) Λαμβάνεται εξίδρωμα ή τμήματα μεταχρωματισμένου ιστού από τον αγγειώδη δακτύλιο του κονδύλου πατάτας ή τις αγγειώδεις δέσμες του στελέχους πατάτας, τομάτας ή άλλων μαραμένων φυτών ξενιστών. Παρασκευάζεται αιώρημα των ανωτέρω σε μικρό όγκο αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού ή σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (προσάρτημα 4) και το αιώρημα αφήνεται για 5-10 λεπτά.

β) Παρασκευάζουμε μία σειρά δεκαδικών αραιώσεων του αιωρήματος.

γ) Μεταφέρουμε 50-100 μl του αιωρήματος και των αραιώσεων σε γενικής χρήσεως θρεπτικό υπόστρωμα (NA, YPGA ή SPA·βλέπε προσάρτημα 2) ή/και σε υλικό του Kelman με τετραζόλιο (προσάρτημα 2) ή/και σε επικυρωμένο εκλεκτικό υπόστρωμα (π.χ. SMSA, βλέπε προσάρτημα 2). Απλώνονται ή εξαπλώνονται γραμμωτά με κατάλληλη τεχνική αραιώσεων επί στερεού υποστρώματος. Αν θεωρηθεί χρήσιμο, παρασκευάζονται ξεχωριστά τρυβλία με αραιωμένο αιώρημα κυττάρων του Ralstonia solanacearum βιοποικιλίας 2 που χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας.

δ) Τα τρυβλία επωάζονται για 2-6 ημέρες στους 28 ^{0}C.

- Στα γενικής χρήσεως θρεπτικά υποστρώματα, οι παθογόνες απομονώσεις R. solanacearum αναπτύσσουν μαργαριταρώδους χροιάς υπόλευκες, επίπεδες, ακανόνιστες και ρευστώδεις αποικίες που εμφανίζουν συχνά χαρακτηριστικές σπείρες στο κέντρο. Οι μη παθογόνες απομονώσεις του R. solanacearum σχηματίζουν μικρές στρογγυλές μη ρευστώδεις, βουτυρώδεις αποικίες που έχουν εντελώς κρεμ-λευκό χρώμα.

- Στο υπόστρωμα Kelman με tetrazolium και στο υπόστρωμα SMSA, οι ελικώσεις είναι αιματέρυθρες. Οι μη παθογόνες απομονώσεις του Ralstonia solanacearum σχηματίζουν μικρές στρογγυλές μη ρευστώδεις, βουτυρώδεις αποικίες που έχουν εντελώς βαθυκόκκινο χρώμα.

4. Δοκιμές ταυτοποίησης του R. solanacearum

Οι δοκιμές για την επιβεβαίωση της ταυτότητας των πιθανών απομονώσεων του R. solanacearum παρουσιάζονται στην ενότητα VI.B.

ΕΝΟΤΗΤΑ III

1. Λεπτομερείς μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του Ralstonia solanacearum σε δείγματα ασυμπτωματικών κονδύλων πατάτας

1.1. Προετοιμασία του δείγματος

Σημείωση:

— Το τυπικό μέγεθος δείγματος είναι 200 κόνδυλοι ανά δοκιμή. Για πιο εντατική δειγματοληψία απαιτούνται περισσότερες δοκιμές σε δείγματα του μεγέθους αυτού. Τυχόν μεγαλύτεροι αριθμοί κονδύλων στο δείγμα θα έχει ως αποτέλεσμα παρεμπόδιση ή δυσκολίες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία όμως μπορεί να εφαρμοσθεί και για δείγματα μικρότερα των 200 κονδύλων στην περίπτωση που είναι λιγότεροι οι διαθέσιμοι κόνδυλοι.

— Η επικύρωση όλων των μεθόδων ανίχνευσης που περιγράφονται στη συνέχεια βασίζεται στη διενέργεια δοκιμών σε δείγματα 200 κονδύλων.

— Το εκχύλισμα πατάτας που περιγράφεται παρακάτω μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του βακτηρίου της δακτυλιωτής σήψης της πατάτας, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Προαιρετική προεπεξεργασία πριν από την προετοιμασία του δείγματος:

α) Τα δείγματα επωάζονται στους 25-30 ^{0}C για διάστημα μέχρι 2 εβδομάδων πριν από τη διενέργεια των δοκιμών για την ενθάρρυνση του πολλαπλασιασμού τυχόν πληθυσμών του *R. solanacearum*.

β) Πλένονται οι κόνδυλοι. Χρησιμοποιούνται κατάλληλα απολυμαντικά (χλωριούχες ενώσεις εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η δοκιμή PCR με στόχο την απομάκρυνση τυχόν DNA του παθογόνου) και απορρυπαντικά μετά από κάθε δείγμα. Οι κόνδυλοι στεγνώνουν στον αέρα. Η ανωτέρω διαδικασία πλύσης είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα που περιβάλλονται από υπερβολικό χώμα καθώς και στην περίπτωση που πρόκειται να εφαρμοσθεί η δοκιμή PCR ή η διαδικασία άμεσης απομόνωσης, αλλά δεν είναι υποχρεωτική.

1.1.1. Με ένα καθαρό και απολυμασμένο νυστέρι ή ειδικό μαχαίρι λαχανικών, αφαιρείται η επιδερμίδα γύρω από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου του κονδύλου έτσι ώστε να φανούν οι αγγειώδεις ιστοί. Αποκόπτουμε με προσοχή ένα μικρό κώνο αγγειώδους ιστού από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου και προσέχουμε ώστε η αφαιρούμενη ποσότητα μη αγγειώδους ιστού να είναι η ελάχιστη δυνατή.

(βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Σημείωση: Κάθε κόνδυλος (με σήψη) που παρουσιάζει ύποπτα συμπτώματα της ασθένειας αφήνεται παράμερα και εξετάζεται χωριστά.

Εάν κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης του κώνου από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου παρατηρηθούν ύποπτα συμπτώματα καστανής σήψη,ς θα πρέπει να διενεργηθεί μακροσκοπική επιθεώρηση του κονδύλου και να κοπεί ο κόνδυλος αυτός κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου. Όλοι οι κομμένοι κόνδυλοι με ύποπτα συμπτώματα πρέπει να διατηρούνται για 2 τουλάχιστον ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η φελλοποίηση και στη συνέχεια να φυλάσσονται στο ψυγείο (4 - 10 ^{0}C) υπό τις κατάλληλες συνθήκες καραντίνας. Όλοι οι κόνδυλοι, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που παρουσιάζουν ύποπτα συμπτώματα,, πρέπει να διατηρούνται σύμφωνα με όσα προβλέπονται στο παράρτημα III.

1.1.2. Οι κώνοι που έχουν ληφθεί από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου συλλέγονται σε μη χρησιμοποιηθέντες περιέκτες μίας χρήσης, οι οποίοι είναι δυνατόν να είναι κλεισμένοι ή/και σφραγισμένοι (στην περίπτωση που οι περιέκτες έχουν ξαναχρησιμοποιηθεί θα πρέπει να καθαρισθούν επιμελώς και να απολυμανθούν με χλωριούχες ενώσεις). Είναι προτιμότερο να υποβάλλονται οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου σε κατεργασία αμέσως. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, αποθηκεύονται στον περιέκτη, χωρίς την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος, στο ψυγείο για 72 ώρες το ανώτατο ή σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες το ανώτατο.

Οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου υποβάλλονται σε κατεργασία με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

α) Οι κώνοι καλύπτονται με επαρκή όγκο (περίπου 40 ml) ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (προσάρτημα 4) και αναταρράσσονται σε περιστροφικό αναδευτήρα (50-100 rpm) για 4 ώρες σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 24 ^{0}C ή για 16-24 ώρες στο ψυγείο.

β) Οι κώνοι ομοιογενοποιούνται με επαρκή όγκο (περίπου 40 ml) ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (προσάρτημα 4), είτε σε αναμείκτη (π.χ. Waring ή Ultra Thurax) είτε με σύνθλιψη σε σφραγισμένο σάκο διαβροχής μίας χρήσης (π.χ. Stomacher ή Bioreba strong guage polythene, 150 mm x 250 mm· αποστειρωμένο διά ακτινοβολίας) χρησιμοποιώντας λαστιχένια ματσόλα ή τον κατάλληλο εξοπλισμό σύνθλιψης(π.χ. Homex).

Σημείωση: Ο κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων είναι υψηλός όταν τα δείγματα έχουν ομοιογενοποιηθεί με τη χρήση αναμείκτη. Πρέπει να ληφθούν προφυλάξεις για την αποφυγή της δημιουργίας αερολύματος ή υπερχείλισης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εξαγωγής. Πρέπει να εξασφαλισθεί ότι για κάθε δείγμα οι λεπίδες και τα δοχεία του αναμεικτήρα αποστειρώνονται λίγο πριν την έναρξη της διαδικασίας. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η δοκιμή PCR, πρέπει να αποφευχθεί η μεταφορά DNA στους περιέκτες ή τον εξοπλισμό σύνθλιψης. Στις περιπτώσεις που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η PCR, συνιστάται η σύνθλιψη σε σάκους μίας χρήσης καθώς και η χρήση σωλήνων μίας χρήσης.

1.1.3. Το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται. Εάν το υγρό εμφανίζεται υπερβολικά θολό, καθίσταται διαυγές είτε με φυγοκέντριση σε χαμηλή ταχύτητα (όχι περισσότερο από 180 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4-10^{0}C) είτε με διήθηση (40-100 μm) με αντλία κενού, πλένοντας το φίλτρο με πρόσθετο (περίπου 10 ml) ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής.

1.1.4. Το βακτηριακό κλάσμα συγκεντρώνεται με φυγοκέντριση σε 7.000 g για 15 λεπτά (ή 10.000 g για 10 λεπτά) σε θερμοκρασία 4-10 ^{0}C και το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.

1.1.5. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιζήματος (προσάρτημα 4). Χρησιμοποιούνται 500 μl για το R. solanacearum, 500 μl για το Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus και 500 μl για σκοπούς αναφοράς. Προστίθεται αποστειρωμένη γλυκερίνη σε τελική συγκέντρωση 10-25% (v/v) στα 500 μl της

κατάλληλης ποσότητας αναφοράς και στην εναπομείνασα κατάλληλη ποσότητα δοκιμής, ανακατεύουμε με στροβιλισμό (vortex) και αποθηκεύουμε στους -16 έως -24 ^{0}C (εβδομάδες) ή στους -68 έως -86 C (μήνες). Οι ποσότητες δοκιμών διατηρούνται σε θερμοκρασία 4-10 ^{0}C κατά τη διεξαγωγή των δοκιμών.

Δεν συνιστάται η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.

Εάν απαιτείται η μεταφορά του εκχυλίσματος, πρέπει να εξασφαλισθεί ότι η διανομή θα πραγματοποιηθεί σε ψυκτικό δοχείο εντός 24 έως 48 ωρών.

1.1.6. Είναι επιτακτικό όπως όλοι οι θετικοί μάρτυρες του R. solanacearum και τα δείγματα κατεργάζονται χωριστά, ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση. Το ίδιο ισχύει και για τις αντικειμενοφόρους της δοκιμής IF και για όλες τις δοκιμές.

1.2. Διενέργεια δοκιμών

Βλέπε το διάγραμμα ροής και την περιγραφή των δοκιμών και των βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων στα σχετικά προσαρτήματα:

Εκλεκτική απομόνωση (βλέπε ενότητα VI.A.4.)
Δοκιμή IF (βλέπε ενότητα VI.A.5)
Δοκιμές PCR (βλέπε ενότητα VI.A.6.)
Δοκιμή FISH (βλέπε ενότητα VI.A.7.)
Δοκιμές ELISA (βλέπε ενότητα VI.A.8.)
Βιοδοκιμή (βλέπε ενότητα VI.A.9.)

2. Λεπτομερείς μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του R. solanacearum σε δείγματα ασυμπτωματικών φυτών πατάτας, τομάτας ή άλλων φυτών ξενιστών

2.1. Προετοιμασία του δείγματος

Σημείωση: Για την ανίχνευση των λανθανόντων πληθυσμών του R. solanacearum συνιστάται ο έλεγχος σύνθετων δειγμάτων. Η διαδικασία είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί κατάλληλα και για σύνθετα δείγματα με έως 200 τμήματα στελεχών. Εάν πραγματοποιούνται επισκοπήσεις, αυτές πρέπει να βασίζονται σε στατιστικά αντιπροσωπευτικό δείγμα του πληθυσμού φυτών υπό εξέταση.

2.1.1. Τα τμήματα στελεχών 1-2 cm συλλέγονται σε κλειστό αποστειρωμένο περιέκτη σύμφωνα με τις ακόλουθες διαδικασίες δειγματοληψίας:

Σπορόφυτα τομάτας φυτωρίου: Με ένα καθαρό και απολυμασμένο μαχαίρι, αφαιρείται τμήμα 1 cm από τη βάση κάθε στελέχους, πάνω ακριβώς από το έδαφος.

Φυτά τομάτας που έχουν αναπτυχθεί στον αγρό ή σε θερμοκήπιο: Με ένα καθαρό και απολυμασμένο μαχαίρι, απομακρύνουμε το χαμηλότερο πλευρικό βλαστό από κάθε φυτό κόβοντας ακριβώς πάνω από το σημείο ένωσης με το κύριο στέλεχος. Απομακρύνουμε το χαμηλότερο τμήμα ενός εκατοστού από κάθε πλευρικό βλαστό.

Άλλοι ξενιστές: Με ένα καθαρό και απολυμασμένο μαχαίρι ή κλαδευτική ψαλίδα, αφαιρείται τμήμα 1 cm από τη βάση κάθε στελέχους, πάνω ακριβώς από το έδαφος. Στην περίπτωση του S. dulcamara ή άλλων φυτών ξενιστών που αναπτύσσονται στο νερό, αφαιρούμε τμήματα (1-2 cm) από τα στελέχη ή στολόνια που βρίσκονται κάτω από το νερό και τα οποία έχουν αναπτύξει ρίζες μέσα στο νερό.

Όταν πραγματοποιείται δειγματοληψία σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία, συνιστάται η εξέταση στατιστικά αντιπροσωπευτικού δείγματος τουλάχιστον 10 φυτών ανά σημείο δειγματοληψίας κάθε πιθανού ζιζάνιου – ξενιστή. Η ανίχνευση του παθογόνου είναι περισσότερο αξιόπιστη κατά τα τέλη της άνοιξης, το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, αν και οι φυσικές μολύνσεις είναι δυνατόν να ανιχνευθούν καθ' όλη τη διάρκεια του έτους στο πολυετές φυτό Solanum dulcamara που αναπτύσσεται στα υδατορεύματα. Γνωστοί ξενιστές είναι τα φυτά εθελοντές της πατάτας, το Solanum dulcamara, το S. nigrum, το Datura stramonium και άλλα είδη της οικογένειας των σολανωδών (Solanaceae). Άλλοι ξενιστές είναι το Pelargonium spp. και το Portulaca oleracea. Ορισμένα ευρωπαϊκά είδη ζιζανίων, τα οποία δύνανται ενδεχομένως να φιλοξενούν πληθυσμούς R. solanacearum βιοποικιλίας 2, φυλής 3 στις ρίζες ή/και τις ριζόσφαιρες υπό ειδικές περιβαλλοντικές συνθήκες είναι τα Atriplex hastata, Bidens pilosa, Cerastium glomeratum, Chenopodium album, Eupatorium cannabinum, Galinsoga parviflora, Ranunculus scleratus, Rorippa spp, Rumex spp., Silene alba, S. nutans., Tussilago farfarra και Urtica dioica.

Σημείωση: Στο στάδιο αυτό μπορεί να γίνει μακροσκοπική εξέταση για εσωτερικά συμπτώματα (χρώση του αγγειώδους ιστού ή βακτηριακό εξίδρωμα). Αφήνουμε παράμερα όλα τα τμήματα στελεχών που παρουσιάζουν συμπτώματα και τα εξετάζουμε ξεχωριστά (βλέπε ενότητα II).

2.1.2. Τα τμήματα στελεχών απολυμαίνονται για σύντομο χρονικό διάστημα με αιθανόλη 70% και στεγνώνονται αμέσως με απορροφητικό χαρτί. Ακολούθως τα τμήματα στελεχών υποβάλλονται σε κατεργασία με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες: είτε,

α) Τα τμήματα καλύπτονται με επαρκή όγκο (περίπου 40 ml) ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (προσάρτημα 4) και αναταρράσσονται σε περιστροφικό αναδευτήρα (50-100 rpm) για 4 ώρες σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 24 ^{0}C ή για 16-24 ώρες στο ψυγείο ή

β) Υποβάλλονται σε κατεργασία αμέσως με σύνθλιψη των τμημάτων εντός ανθεκτικού σάκκου διαβροχής (π.χ. Stomacher ή Bioreba) με τον κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (προσάρτημα 4) χρησιμοποιώντας λαστιχένια ματσόλα ή τον κατάλληλο εξοπλισμό σύνθλιψης (π.χ. Homex). Στην περίπτωση που αυτό δεν είναι δυνατόν, τα τμήματα στελέχους αποθηκεύονται στο ψυγείο για χρονικό διάστημα 72 ωρών το μέγιστο ή σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 24 ωρών το μέγιστο.

2.1.3. Το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται αφού κατακαθίσει για 15 λεπτά.

2.1.4. Περαιτέρω διαύγαση του εκχυλίσματος ή της συγκέντρωσης του βακτηριακού κλάσματος δεν απαιτείται συνήθως αλλά είναι δυνατόν να επιτευχθεί με διήθηση ή/και φυγοκέντριση όπως περιγράφεται στην ενότητα III.1.1.3 – 1.1.5.

2.1.5. Το αδιάλυτο ή συγκεντρωμένο εκχύλισμα δείγματος χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη. Το ήμισυ διατηρείται σε 4-10 ^{0}C κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής και το άλλο μισό φυλάσσεται με 10-25% (v/v) αποστειρωμένη γλυκερίνη σε θερμοκρασία -16 έως -24^{0}C (εβδομάδες) ή σε θερμοκρασία -68 έως -86 C (μήνες) για την περίπτωση που χρειασθεί η διενέργεια περαιτέρω δοκιμών.

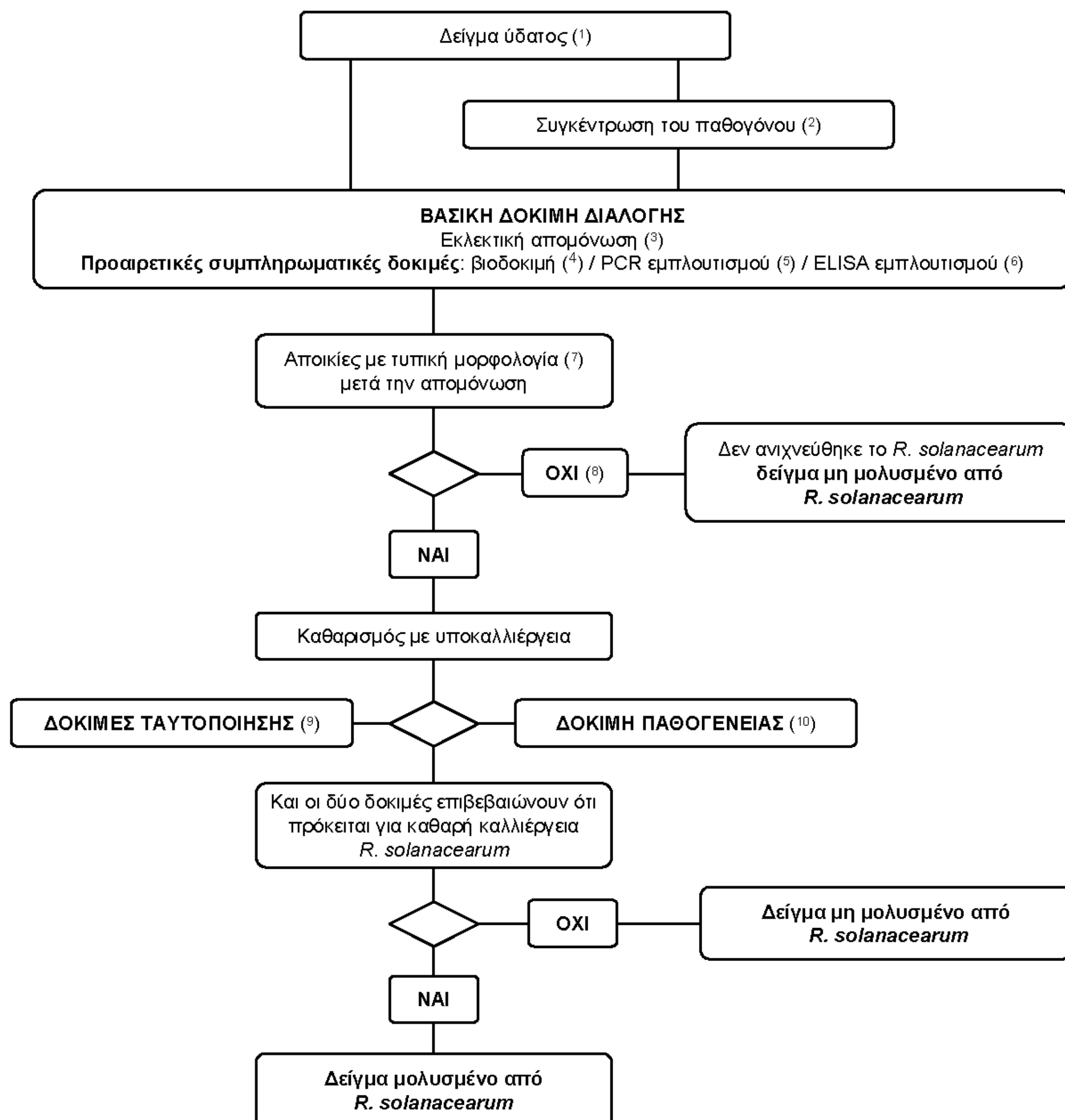
2.2. Διενέργεια δοκιμών

Βλέπε το διάγραμμα ροής και την περιγραφή των δοκιμών και των βελτιστοποιημένων πρωτοκόλλων στα σχετικά προσαρτήματα:

Εκλεκτική απομόνωση (βλέπε ενότητα VI.A.4.)
Δοκιμή IF (βλέπε ενότητα VI.A.5)
Δοκιμές PCR (βλέπε ενότητα VI.A.6.)
Δοκιμή FISH (βλέπε ενότητα VI.A.7.)
Δοκιμές ELISA (βλέπε ενότητα VI.A.8.)
Βιοδοκιμή (βλέπε ενότητα VI.A.9.)

ΕΝΟΤΗΤΑ IV

1. Σχήμα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του *R. solanacearum* στο νερό



(1) Βλέπε ενότητα IV.2.1. για τις συνιστώμενες διαδικασίες δειγματοληψίας.
(2) Οι μέθοδοι συγκέντρωσης του παθογόνου περιγράφονται στην ενότητα IV.2.1. Η συγκέντρωση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πληθυσμών τόσο του παθογόνου όσο και των ανταγωνιστικών σαπροφυτικών βακτηρίων και συνιστάται μόνον εάν δεν οδηγεί στην παρεμπόδιση της δοκιμής απομόνωσης.
(3) Η δοκιμή εκλεκτικής απομόνωσης περιγράφεται στην ενότητα VI.A.4.
(4) Η βιοδοκιμή περιγράφεται στην ενότητα VI.A.9.
(5) Οι μέθοδοι εμπλουτισμού PCR περιγράφονται στις ενότητες VI.A.4.2 και VI.A.6.
(6) Οι μέθοδοι εμπλουτισμού ELISA περιγράφονται στις ενότητες VI.A.4.2 και VI.A.8.
(7) Η τυπική μορφολογία των αποικιών περιγράφεται στην ενότητα II.3.δ.
(8) Η καλλιέργεια είναι δυνατόν να αποτύχει λόγω ανταγωνισμού ή παρεμπόδισης από σαπροφυτικά βακτήρια. Εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι υψηλοί πληθυσμοί σαπροφύτων επηρεάζουν την αξιοπιστία της απομόνωσης, επαναλαμβάνονται οι δοκιμές απομόνωσης με την αραίωση του δείγματος σε αποστειρωμένο νερό.
(9) Η αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρών πιθανών καλλιεργειών του *R. solanacearum* επιτυγχάνεται με τη χρήση των δοκιμών που περιγράφονται στην ενότητα VI.B.
(10) Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα VI.Γ.

2. Μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του R. solanacearum στο νερό

Αρχή

Το επικυρωμένο σχήμα ανίχνευσης που περιγράφεται στην ενότητα αυτή, εφαρμόζεται για την ανίχνευση του παθογόνου σε δείγματα επιφανειακών υδάτων και μπορεί επίσης να εφαρμοσθεί για την εξέταση δειγμάτων λυμάτων κατεργασίας πατάτας ή ακάθαρτων υδάτων. Είναι σημαντικό, ωστόσο, να σημειωθεί ότι η αναμενόμενη ευαισθησία της ανίχνευσης θα ποικίλλει ανάλογα με το υπόστρωμα. Η ευαισθησία της δοκιμής απομόνωσης επηρεάζεται από τους πληθυσμούς των ανταγωνιστικών σαπροφυτικών βακτηρίων που είναι συνήθως κατά πολύ περισσότεροι στα λύματα κατεργασίας πατάτας και ακάθαρτων υδάτων απ' ό,τι στα επιφανειακά ύδατα. Ενώ το σχήμα που ακολουθεί αναμένεται να ανιχνεύσει τόσο λίγα όσο 103 κύτταρα ανά λίτρο σε επιφανειακά ύδατα, η ευαισθησία ανίχνευσης σε λύματα κατεργασίας πατάτας ή ακάθαρτων υδάτων είναι πιθανόν να είναι κατά πολύ μικρότερη. Για το λόγο αυτό, συνιστάται η εξέταση λυμάτων μετά από κάθε εργασία καθαρισμού (π.χ. καθίζηση ή διήθηση) κατά την οποία μειώνονται οι πληθυσμοί των σαπροφυτικών βακτηρίων. Οι περιορισμοί όσον αφορά την ευαισθησία του σχήματος δοκιμών πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση της αξιοπιστίας οιωνδήποτε αρνητικών αποτελεσμάτων. Παρά το γεγονός ότι το εν λόγω σχήμα έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε εργασίες επισκόπησης για τον προσδιορισμό της παρουσίας ή απουσίας του παθογόνου σε επιφανειακά ύδατα, οι περιορισμοί που το συνοδεύουν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν χρησιμοποιείται σε παρόμοιες επισκοπήσεις λυμάτων κατεργασίας πατάτας ή ακάθαρτων υδάτων.

2.1. Προετοιμασία του δείγματος

Σημείωση:

- Η ανίχνευση του R. solanacearum σε επιφανειακά ύδατα είναι πιο αξιόπιστη κατά τα τέλη της άνοιξης, το καλοκαίρι και το φθινόπωρο όταν η θερμοκρασία του ύδατος υπερβαίνει τους 15 °C.

- Η επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά την προαναφερθείσα χρονική περίοδο σε προσδιορισθέντα σημεία δειγματοληψίας θα ενισχύσει την αξιοπιστία της ανίχνευσης μειώνοντας τις επιδράσεις των κλιματικών μεταβολών.

- Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι επιδράσεις των ισχυρών βροχοπτώσεων και της γεωγραφίας των υδάτινων ρευμάτων έτσι ώστε να αποφεύγονται τα αποτελέσματα μεγάλης αραιώσεως που ενδέχεται να καταστήσουν ασαφή την παρουσία του παθογόνου.

- Πρέπει να λαμβάνονται δείγματα επιφανειακών υδάτων που βρίσκονται κοντά σε φυτά ξενιστές εάν τα εν λόγω φυτά υπάρχουν.

2.1.1. Σε επιλεγμένα σημεία δειγματοληψίας, συλλέγουμε δείγματα νερού γεμίζοντας αποστειρωμένους σωλήνες ή φιάλες μίας χρήσεως, εάν είναι δυνατόν, σε βάθος κάτω των 30 cm και εντός αποστάσεως 2 m από την όχθη. Όσον αφορά τα λύματα κατεργασίας και ακάθαρτων υδάτων, συλλέγουμε δείγματα από το σημείο εκροής των λυμάτων. Συνιστώνται μεγέθη δειγμάτων έως 500 ml ανά σημείο δειγματοληψίας. Εάν προτιμώνται μικρότερα δείγματα, συνιστάται η λήψη δειγμάτων σε τουλάχιστον 3 περιπτώσεις ανά σημείο δειγματοληψίας, και κάθε δείγμα να αποτελείται από 2 επαναληπτικά υπο-δείγματα τουλάχιστον των 30 ml. Για εντατική εργασία επισκόπησης, επιλέγουμε τουλάχιστον 3 σημεία δειγματοληψίας ανά 3 χλμ υδάτινου ρεύματος και εξασφαλίζουμε ότι διενεργείται δειγματοληψία και στους παραπόταμους που εισέρχονται στο υδάτινο ρεύμα.

2.1.2. Τα δείγματα μεταφέρονται σε συνθήκες ψύχους και σκότους (4-10 °C) και εξετάζονται εντός 24 ωρών.

2.1.3. Εάν είναι απαραίτητο, το βακτηριακό κλάσμα μπορεί να συγκεντρωθεί χρησιμοποιώντας μία από τις ακόλουθες μεθόδους:

α) Τα υπο-δείγματα των 30-50 ml φυγοκεντρούνται σε 10.000 g για 10 λεπτά (ή 7.000 g για 15 λεπτά) κατά προτίμηση στους 4-10 °C, απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα αναδιαλύεται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιζήματος (προσάρτημα 4).

β) Διήθηση από μεμβράνη (ελάχιστο μέγεθος πόρων 0,45 μm) ακολουθούμενη από πλύση του φίλτρου σε 5-10 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιζήματος και παρακράτηση των εκπλυμάτων. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται για μεγαλύτερους όγκους νερού που περιέχουν μικρότερους αριθμούς σαπροφύτων.

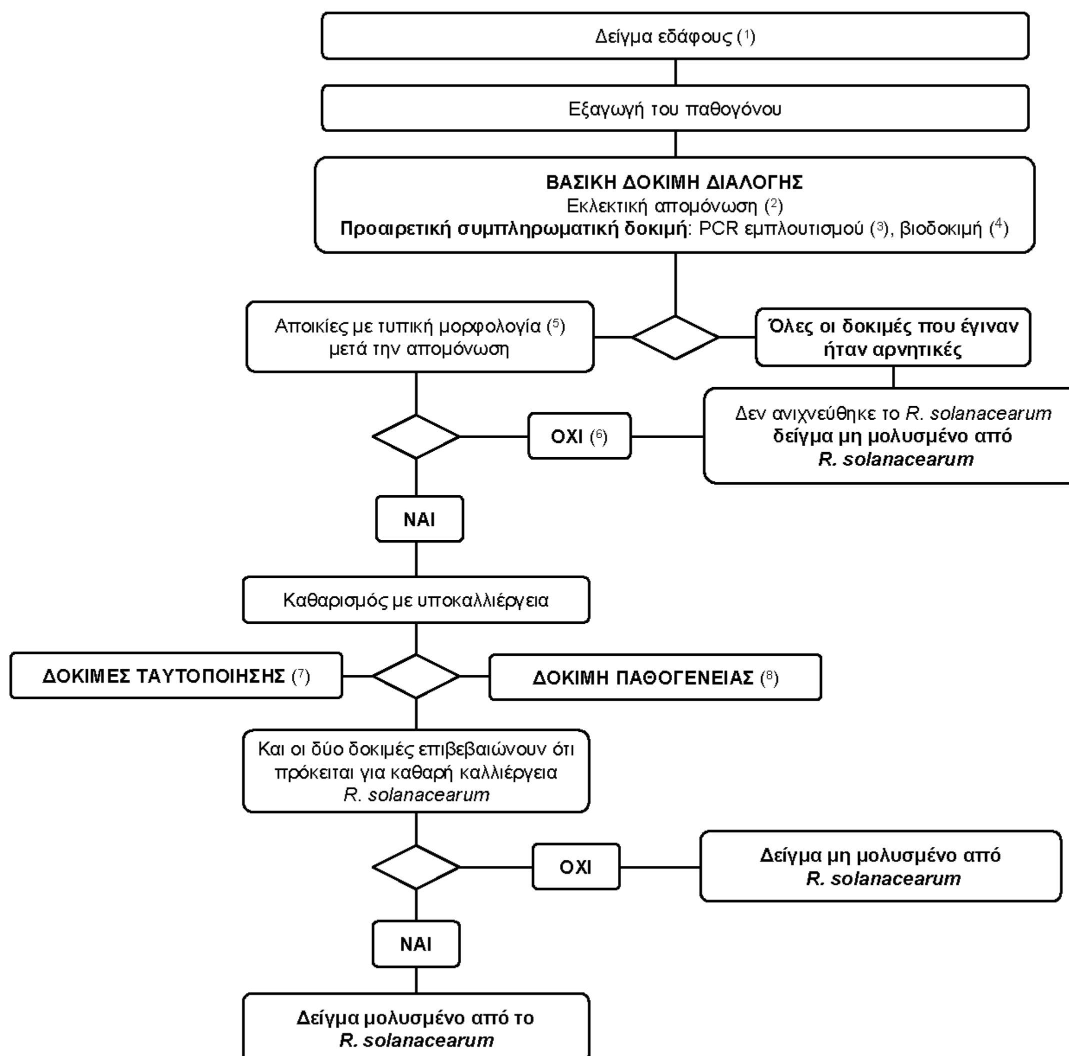
Η συγκέντρωση δεν συνιστάται συνήθως για δείγματα λυμάτων κατεργασίας πατάτας ή ακάθαρτων υδάτων καθώς αυξημένοι πληθυσμοί ανταγωνιστικών σαπροφυτικών βακτηρίων θα παρεμποδίζουν την ανίχνευση του Ralstonia solanacearum.

2.2. Διενέργεια δοκιμών

Βλέπε το διάγραμμα ροής και την περιγραφή των δοκιμών στα σχετικά προσαρτήματα.

ΕΝΟΤΗΤΑ V

1. Σχήμα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του *R. solanacearum* στο έδαφος



(1) Βλέπε ενότητα V.2.1. για τις συνιστώμενες διαδικασίες δειγματοληψίας.

(2) Η δοκιμή εκλεκτικής απομόνωσης περιγράφεται στην ενότητα VI.A.4.

(3) Οι μέθοδοι εμπλουτισμού PCR περιγράφονται στις ενότητες VI.A.4.2 και VI.A.6.

(4) Η βιοδοκιμή περιγράφεται στην ενότητα VI.A.9.

(5) Η τυπική μορφολογία των αποικιών περιγράφεται στην ενότητα II.3.δ.

(6) Η καλλιέργεια είναι δυνατόν να αποτύχει λόγω ανταγωνισμού ή παρεμπόδισης από σαπροφυτικά βακτήρια. Εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι μεγάλοι πληθυσμοί σαπροφύτων επηρεάζουν την αξιοπιστία της απομόνωσης, επαναλαμβάνονται οι δοκιμές απομόνωσης μετά την περαιτέρω αραίωση του δείγματος.

(7) Η αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρών πιθανών καλλιεργειών του *R. solanacearum* επιτυγχάνεται με τη χρήση των δοκιμών που περιγράφονται στην ενότητα VI.B.

(8) Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα VI.Γ.

Μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του R. solanacearum στο έδαφος

Αρχές

Το επικυρωμένο σχήμα ανίχνευσης που περιγράφεται στην ενότητα αυτή ισχύει για την ανίχνευση του παθογόνου σε δείγματα εδάφους αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης για τη δοκιμή δειγμάτων στερεών αποβλήτων κατεργασίας πατάτας ή ιλύος επεξεργασίας λυμάτων. Θα πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι οι εν λόγω μέθοδοι δεν διαθέτουν επαρκή ευαισθησία έτσι ώστε να εγγυηθούν την ανίχνευση χαμηλών ή/και ακανόνιστα διασκορπισμένων πληθυσμών του Ralstonia solanacearum που είναι δυνατόν να υπάρχουν σε φυσικώς μολυσμένα δείγματα των εν λόγω υποστρωμάτων.

Οι περιορισμοί του εν λόγω σχήματος δοκιμής όσον αφορά την ευαισθησία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση της αξιοπιστίας τυχόν αρνητικών αποτελεσμάτων καθώς επίσης και όταν χρησιμοποιούνται σε επισκοπήσεις για τον προσδιορισμό της παρουσίας ή απουσίας του παθογόνου στο έδαφος ή την ιλύ. Η πιο αξιόπιστη δοκιμή για την ανίχνευση της παρουσίας του παθογόνου στο έδαφος ενός αγρού είναι η φύτευση ευπαθούς ξενιστή και η παρακολούθησή του όσον αφορά το ενδεχόμενο μόλυνσης, αλλά ακόμη και με τη μέθοδο αυτή τα χαμηλά επίπεδα μόλυνσης θα διαφύγουν την ανίχνευση.

2.1. Προετοιμασία του δείγματος

2.1.1. Η δειγματοληψία εδάφους στον αγρό θα πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις τυποποιημένες αρχές της δειγματοληψίας για νηματώδεις. Συλλέγουμε 0,5 - 1 kg εδάφους ανά δείγμα από 60 θέσεις ανά 0,3 ha από βάθος 10-20 cm (ή σε επιφάνεια 7x7 μέτρων). Εάν υπάρχουν υπόνοιες για την παρουσία του παθογόνου, αυξάνουμε τον αριθμό σημείων συλλογής σε 120 ανά 0,3 ha. Διατηρούμε τα δείγματα στους 12-15 ^{0}C πριν από τη διενέργεια των δοκιμών. Η δειγματοληψία ιλύος κατεργασίας πατάτας ή λυμάτων πραγματοποιείται με τη συλλογή συνολικά 1 kg από τοποθεσίες που αντιστοιχούν στο συνολικό όγκο της ιλύος προς εξέταση. Αναμειγνύουμε καλά κάθε δείγμα πριν από τη διενέργεια δοκιμής.

2.1.2. Διασκορπίζουμε υπο-δείγματα των 10 - 25 g εδάφους ή ιλύος με περιστροφική ανάδευση (250 rpm) σε 60-150 ml ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (προσάρτημα 4) για μέγιστο χρονικό διάστημα 2 ωρών. Εάν είναι απαραίτητο, η προσθήκη 0,02% αποστειρωμένου Tween-20 και 10 - 20 g αποστειρωμένου σκύρου μπορεί να ενισχύσει το διασκορπισμό.

2.1.3. Το αιώρημα διατηρείται στους 4 ^{0}C κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της δοκιμής.

2.2. Διενέργεια δοκιμών

Βλέπε το διάγραμμα ροής και την περιγραφή των δοκιμών στα σχετικά προσαρτήματα.

ΕΝΟΤΗΤΑ VI

Βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του R. solanacearum

Α. Δοκιμές διάγνωσης και ανίχνευσης

1. Δοκιμή εκκρίσεων από το στέλεχος

Η παρουσία του R. solanacearum σε στελέχη μαραμένων φυτών πατάτας, τομάτας ή άλλων ξενιστών μπορεί να εκτιμηθεί με την ακόλουθη απλή προκαταρκτική δοκιμή: Κόβουμε το στέλεχος πάνω ακριβώς από το έδαφος. Αναρτάται η κομμένη επιφάνεια μέσα σε σωλήνα με καθαρό νερό. Παρατηρούμε εάν σε λίγα λεπτά παρουσιαστεί η χαρακτηριστική αυθόρμητη ροή βακτηριακού γλοιώδους εκκρίματος με τη μορφή κλωστών από τις κομμένες αγγειώδεις δέσμες.

2. Ανίχνευση πολυ-β-υδροξυβουτυρικών κοκκίων

1. Παρασκευάζουμε επίχρισμα της βακτηριακής εξίδρωσης από τους μολυσμένους ιστούς ή από 48ωρη καλλιέργεια σε υλικό YPGA ή SPA (προσάρτημα 2) σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου.

2. Παρασκευάζουμε επίσης επιχρίσματα θετικού μάρτυρα από στέλεχος του R. solanacearum βιοποικιλίας 2 και, αν θεωρηθεί χρήσιμο, ένα επίχρισμα αρνητικού μάρτυρα ενός είδους γνωστού ως αρνητικού στην παραγωγή PHB.

3. Αφήνουμε να ξηρανθούν και περνούμε την κατώτερη επιφάνεια κάθε αντικειμενοφόρου γρήγορα πάνω από φλόγα για να προσηλωθούν τα επιχρίσματα.

4. Ακολουθεί χρώση του παρασκευάσματος με Nile Blue ή Sudan Black και εξετάζονται στο μικροσκόπιο ως εξής:

Δοκιμή Nile Blue

α) Κάθε αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως με 1% υδατικό διάλυμα Nile Blue A και επωάζεται για 10 λεπτά στους 55 ^{0}C.

β) Αποστραγγίζουμε το διάλυμα χρώσεως. Πλένουμε την πλάκα για λίγο προσεκτικά με ρέον νερό της βρύσης. Απομακρύνουμε την περίσσεια του νερού με απορροφητικό χαρτί.

γ) Περιλούζουμε το επίχρισμα με 8% υδατικό διάλυμα οξικού οξέος και το αφήνουμε για επώαση επί 1 λεπτό σε θερμοκρασία εργαστηρίου.

δ) Πλένουμε την πλάκα για λίγο προσεκτικά με ρέον νερό της βρύσης. Απομακρύνουμε την περίσσεια του νερού με απορροφητικό χαρτί.

ε) Ξαναρίχνουμε μία σταγόνα νερό και τοποθετούμε μία καλυπτρίδα.

στ) Εξετάζουμε το χρωσμένο επίχρισμα με μικροσκόπιο επιφθορισμού στα 450 nm με ελαιοκαταδυτικό φακό σε μεγέθυνση 600-1000 χρησιμοποιώντας ένα έλαιο- ή υδατοκαταδυτικό αντικειμενικό φακό.

ζ) Παρατηρούμε για την παρουσία κοκκίων PHB με λαμπρό πορτοκαλί φθορισμό. Επίσης παρατηρούμε με κανονικό διερχόμενο φως για, να εξασφαλιστεί ότι τα κοκκία είναι ενδοκυτταρικά και ότι η μορφολογία των κυττάρων είναι η τυπική του R. solanacearum.

Δοκιμή Sudan Black:

α) Κάθε αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως με 0,3% διάλυμα Sudan Black B σε 70% αιθανόλη και επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία εργαστηρίου.

β) Αποστραγγίζουμε το διάλυμα χρώσεως, πλένουμε την πλάκα για λίγο προσεκτικά με ρέον νερό της βρύσης και απομακρύνουμε την περίσσεια του νερού με απορροφητικό χαρτί.

γ) Οι αντικειμενοφόροι βυθίζονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε ξυλόλη και στεγνώνουμε με απορροφητικό χαρτί. Προσοχή: Η ξυλόλη είναι επιβλαβής, γι' αυτό πρέπει να λαμβάνουμε τις απαραίτητες προφυλάξεις ασφαλείας και να εργαζόμαστε σε απαγωγό εστία.

δ) Περιλούζουμε τις αντικειμενοφόρους με 0,5% (β/ο) υδατικό διάλυμα σαφρανίνης και το αφήνουμε για 10 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία εργαστηρίου. Προσοχή:

Η σαφρανίνη είναι επιβλαβής, γι' αυτό πρέπει να λαμβάνουμε τις απαραίτητες προφυλάξεις ασφαλείας και να εργαζόμαστε σε απαγωγό εστία.

ε) Ξεπλένουμε ήπια με ρέον νερό της βρύσης, στεγνώνουμε με απορροφητικό χαρτί και τοποθετούμε μία καλυπτρίδα.

στ) Εξετάζουμε τα χρωσμένα επιχρίσματα σε φωτομικροσκόπιο χρησιμοποιώντας διερχόμενο φως με ελαιοκαταδυτικό φακό και με κλίμακα μεγέθυνσης 1000 χρησιμοποιώντας ένα ελαιοκαταδυτικό αντικειμενικό.

ζ) Παρατηρούμε για κοκκία PHB που έχουν χρωσθεί μπλε-μαύρα μέσα σε κύτταρα του R. solanacearum με χρωσμένα ροζ κυτταρικά τοιχώματα.

3. Δοκιμές οροσυγκόλλησης

Η συγκόλληση των κυττάρων του R. solanacearum σε βακτηριακή εξίδρωση ή εκχυλίσματα ιστών που παρουσιάζουν συμπτώματα παρατηρείται καλύτερα με τη χρήση επικυρωμένων αντισωμάτων (βλέπε παράρτημα 3) επισημασμένων με τους κατάλληλους χρωματικούς δείκτες, όπως κόκκινα κύτταρα Staphylococcus aureus ή χρωσμένα σωματίδια latex. Εάν χρησιμοποιείται συσκευασία που διατίθεται στο εμπόριο (βλέπε προσάρτημα 3), ακολουθούμε τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε διαφορετική περίπτωση, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

α) Αναμειγνύουμε σταγόνες ενός αιωρήματος επισημασμένου αντισώματος και βακτηριακής εξίδρωσης (περίπου 5 μl το καθένα) σε φατνία πολυφατνιακών αντικειμενοφόρων δοκιμής.

β) Παρασκευάζουμε θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες χρησιμοποιώντας αιωρήματα του R. solanacearum βιοποικιλίας 2 και ετερόλογου στελέχους.

γ) Παρατηρούμε εάν υπάρχει συγκόλληση σε θετικά δείγματα μετά από ελαφρά ανάμειξη για 15 δευτερόλεπτα.

4. Εκλεκτική απομόνωση

4.1. Εκλεκτική απομόνωση επί στερεού υποστρώματος

Σημείωση: Προτού χρησιμοποιήσετε για πρώτη φορά τη μέθοδο αυτή, πρέπει να πραγματοποιήσετε προκαταρκτικές δοκιμές έτσι ώστε να εξασφαλισθεί η αναπαραγώγιμη ανίχνευση 10^3 έως 10^4 μονάδων που σχηματίζουν αποικίες του R. solanacearum ανά ml που προστίθεται σε εκχυλίσματα από δείγματα που προηγουμένως έδειξαν αρνητικά αποτελέσματα.

Χρησιμοποιείστε ένα κατάλληλο επικυρωμένο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα όπως το SMSA (όπως τροποποιήθηκε από τον Elphinstone et al., 1996· βλέπε προσάρτημα 2).

Χρειάζεται επίσης προσοχή ώστε το R. solanacearum να διαφοροποιείται από τυχόν άλλα βακτήρια που μπορεί να αναπτύξουν αποικίες στο θρεπτικό υπόστρωμα. Επιπροσθέτως, οι αποικίες του R. solanacearum ενδέχεται να παρουσιάζουν μη τυπική μορφολογία εάν τα τρυβλία έχουν υπερβολικούς πληθυσμούς του βακτηρίου ή υπάρχουν επίσης ανταγωνιστικά βακτήρια. Στις περιπτώσεις που υπάρχουν υπόνοιες για φαινόμενα ανταγωνισμού, το δείγμα πρέπει να επανεξετάζεται με διαφορετική δοκιμή.

Είναι δυνατόν να αναμένεται η ύψιστη ευαισθησία ανίχνευσης με τη μέθοδο αυτή όταν χρησιμοποιούνται εκχυλίσματα δειγμάτων που έχουν μόλις παρασκευασθεί. Ωστόσο, η μέθοδος εφαρμόζεται επίσης για εκχυλίσματα που έχουν αποθηκευθεί σε γλυκερίνη στους - 68 έως -86 °C.

Ως θετικοί μάρτυρες, παρασκευάζονται δεκαδικές αραιώσεις από αιώρημα 10^6 cfu ανά ml παθογόνου στελέχους του R. solanacearum βιοποικιλίας 2 (π.χ. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Για την αποφυγή ενδεχόμενης μόλυνσης, παρασκευάζονται θετικοί μάρτυρες πλήρως διαχωρισμένοι από τα δείγματα προς δοκιμή.

Η καταλληλότητα κάθε νέας παρτίδας εκλεκτικού υποστρώματος όσον αφορά την ανάπτυξη του παθογόνου πρέπει να ελέγχεται πριν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των συνήθων δειγμάτων.

Η δοκιμή του υλικού των μαρτύρων γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως αυτή του ή των δειγμάτων.

4.1.1. Πραγματοποιείται η κατάλληλη τεχνική αραιώσεων επί στερεού υποστρώματος με στόχο να εξασφαλισθεί ότι αραιώνονται οποιοιδήποτε πληθυσμοί σαπροφύτων που σχηματίζουν αποικίες. Απλώνονται 50 - 100 μl ανά τρυβλίο εκχυλίσματος δείγματος και κάθε αραίωση.

4.1.2. Τα τρυβλία επωάζονται στους 28 °C. Γίνεται ανάγνωση των τρυβλίων μετά από 48 ώρες και στη συνέχεια κάθε μέρα για 6 ημέρες. Οι τυπικές αποικίες του R. solanacearum σε θρεπτικό υπόστρωμα SMSA είναι γαλακτώδους χροιάς λευκές, επίπεδες, ακανόνιστες και ρευστώδεις και μετά από επώαση 3 ημερών αναπτύσσουν ρόδινο έως αιματέρυθρο χρώμα στο κέντρο με εσωτερικές ραβδώσεις ή ελικώσεις.

(βλέπε http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Σημείωση: Ορισμένες φορές στο εν λόγω θρεπτικό υπόστρωμα σχηματίζονται μη τυπικές αποικίες του R. solanacearum. Οι αποικίες αυτές ενδέχεται να είναι μικρές, στρογγυλές, εντελώς κόκκινες στο χρώμα και μη ρευστώδεις ή μόνον μερικώς ρευστώδεις και, για το λόγο αυτό, είναι δύσκολο να τις ξεχωρίσει κανείς από σαπροφυτικά βακτήρια που σχηματίζουν αποικίες.

4.1.3. Καθαρίζονται οι πιθανές αποικίες του R. solanacearum ύστερα από γραμμωτή εξάπλωση ή εξάπλωση διαδοχικών αραιώσεων σε τρυβλία σε γενικής χρήσης θρεπτικό υλικό για την επίτευξη απομονωμένων αποικιών (βλέπε προσάρτημα 2).

4.1.4. Οι καλλιέργειες αποθηκεύονται για βραχέα διαστήματα σε αποστειρωμένο νερό (pH 6-8, χωρίς χλώριο) σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι ή για μακρά διαστήματα σε κατάλληλο κρυοπροστατευτικό υλικό στους -68 έως -86 °C ή λυοφιλιωμένες.

4.1.5. Ταυτοποιούνται οι πιθανές καλλιέργειες (βλέπε ενότητα VI.B.) και πραγματοποιείται δοκιμή παθογένειας (βλέπε ενότητα VI.Γ).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής εκλεκτικής απομόνωσης επί στερεού θρεπτικού υποστρώματος

Η δοκιμή αυτή είναι αρνητική εάν δεν παρατηρηθούν βακτηριακές αποικίες μετά από 6 ημέρες ή δεν εντοπισθούν πιθανές τυπικές αποικίες του R. solanacearum, υπό την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχουν υπόνοιες για παρεμπόδιση λόγω ανταγωνισμού από άλλα βακτήρια και ότι στους θετικούς μάρτυρες έχουν βρεθεί τυπικές αποικίες R. solanacearum.

Η δοκιμή είναι θετική εάν απομονωθούν πιθανές αποικίες του R. solanacearum.

4.2. Διαδικασία εμπλουτισμού

Χρησιμοποιούμε ένα επικυρωμένο υπόστρωμα εμπλουτισμού όπως ο τροποποιημένος ζωμός Wilbrink (βλέπε προσάρτημα 2).

Η διαδικασία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκλεκτική αύξηση των πληθυσμών του R. solanacearum σε εκχυλίσματα δειγμάτων και για την ενίσχυση της ευαισθησίας ανίχνευσης. Η εν λόγω διαδικασία, αραιώνει επίσης αποτελεσματικά παρεμποδιστές της αντίδρασης PCR (1:100). Θα πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι ο εμπλουτισμός του R. solanacearum μπορεί να αποτύχει λόγω ανταγωνισμού από σαπροφυτικούς οργανισμούς οι οποίοι επίσης εμπλουτίζονται ταυτόχρονα. Για το λόγο αυτό, η απομόνωση του R. solanacearum από εμπλουτισμένες καλλιέργειες ζωμού ενδέχεται να είναι δύσκολη. Επιπροσθέτως, καθώς μπορεί να αυξηθούν οι πληθυσμοί ορολογικά σχετιζομένων βακτηρίων, συνιστάται η χρήση εξειδικευμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων αντί πολυκλωνικών αντισωμάτων όσον αφορά τις περιπτώσεις που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η δοκιμή ELISA.

4.2.1. Όσον αφορά την PCR εμπλουτισμού, μεταφέρουμε 100 μl εκχυλίσματος δείγματος σε 10 ml ζωμού εμπλουτισμού (προσάρτημα 2) που έχει προηγουμένως τοποθετηθεί σε επιμέρους ίσες ποσότητες σε σωλήνες ή φιάλες απαλλαγμένες από DNA. Για την ELISA εμπλουτισμού, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες αναλογίες εκχυλίσματος δείγματος σε σχέση με το ζωμό (π.χ. 100 μl σε 1,0 ml ζωμού εμπλουτισμού).

4.2.2. Επωάζουμε για 72 ώρες στους 27 έως 30 °C σε ανακινούμενη ή στατική καλλιέργεια διατηρώντας το καπάκι προσαρμοσμένο χαλαρά έτσι ώστε να είναι δυνατός ο αερισμός.

4.2.3. Αναμειγνύουμε καλά πριν από τη διεξαγωγή των δοκιμών ELISA ή PCR.

4.2.4. Επεξεργαζόμαστε τον εμπλουτισμένο ζωμό με τον ίδιο τρόπο όπως το (τα) δείγμα(-τα) στις ανωτέρω δοκιμές.

Σημείωση: Εάν αναμένουμε παρεμπόδιση του εμπλουτισμού του R. solanacearum λόγω των υψηλών πληθυσμών ορισμένων ανταγωνιστικών σαπροφυτικών βακτηρίων, είναι δυνατόν να παραχθούν καλύτερα αποτελέσματα εάν εμπλουτισθούν τα εκχυλίσματα δείγματος πριν από οιαδήποτε φυγοκέντριση ή άλλες ενέργειες συγκέντρωσης.

5. Δοκιμή IF

Αρχή

Η χρήση της δοκιμής IF ως αρχικής δοκιμής διαλογής συνιστάται λόγω της αποδεδειγμένης ευρωστίας της για την επίτευξη των απαιτούμενων ορίων.

Όταν η δοκιμή IF χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής και η ανάγνωση IF είναι θετική, πρέπει να πραγματοποιηθεί η δοκιμή απομόνωσης, PCR ή FISH ως δεύτερη δοκιμή διαλογής. Όταν η δοκιμή IF χρησιμοποιείται ως δεύτερη δοκιμή διαλογής και η ανάγνωση IF είναι θετική, απαιτείται διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών σύμφωνα με το διάγραμμα ροής για την ολοκλήρωση της ανάλυσης.

Σημείωση: Χρησιμοποιούμε επικυρωμένη πηγή αντισωμάτων του R. solanacearum (βλέπε Ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Συνιστάται ο προσδιορισμός του τίτλου για κάθε νέα παρτίδα αντισωμάτων. Ως τίτλος ορίζεται η μεγαλύτερη αραίωση στην οποία λαμβάνει χώρα η βέλτιστη αντίδραση όταν υποβάλλεται σε δοκιμή αιώρημα που περιέχει 10^5 έως 10^6 κύτταρα ανά ml του ομόλογου στελέχους του R. solanacearum και χρησιμοποιείται κατάλληλο σύμπλοκο ισοθειοκυανικής φθορεϊσίνης (FITC) σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Οι επικυρωμένοι πολυκλωνικοί αντιορροί πρέπει να έχουν τίτλο IF τουλάχιστον 1:2000. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, τα αντισώματα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε αραίωση(-εις) εργασίας (WD) στον τίτλο ή κοντά στον τίτλο.

Η δοκιμή πρέπει να πραγματοποιείται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που έχουν μόλις παρασκευασθεί. Εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε εκχυλίσματα που έχουν αποθηκευθεί σε θερμοκρασία -68 έως -86 °C σε γλυκερίνη. Η γλυκερίνη είναι δυνατόν να αφαιρεθεί από το δείγμα με την προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιζήματος (προσάρτημα 4), εκ νέου φυγοκέντριση για 15 λεπτά σε 7000 g και επανασχηματισμό αιωρήματος σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ιζήματος. Συχνά αυτό δεν είναι αναγκαίο, ιδιαίτερα εάν τα δείγματα αντικειμενοφόρου έχουν προσηλωθεί στις αντικειμενοφόρους με διέλευση από φλόγα.

Παρασκευάζονται ξεχωριστά ως θετικοί μάρτυρες αντικειμενοφόροι από ομόλογο στέλεχος ή άλλο στέλεχος αναφοράς του R. solanacearum, που είναι αιώρημα σε εκχύλισμα πατάτας, όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 3 Β, και προαιρετικά σε ρυθμιστικό διάλυμα.

Ως παρόμοιοι μάρτυρες πρέπει να χρησιμοποιούνται, όποτε είναι δυνατόν, στην ίδια αντικειμενοφόρο, φυσικώς μολυσμένοι ιστοί (που διατηρούνται με λυοφιλίωση ή κατάψυξη στους -16 έως -24°C).

Ως αρνητικοί μάρτυρες είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν κατάλληλες ποσότητες εκχυλίσματος δείγματος που προηγουμένως είχε δοκιμαστεί και ήταν αρνητικό όσον αφορά το R. solanacearum.

Στο προσάρτημα 3 παρατίθενται τυποποιημένα υλικά θετικών και αρνητικών μαρτύρων που διατίθενται προς χρήση στο πλαίσιο της εν λόγω δοκιμής.

Χρησιμοποιούνται πολυφατνιακές αντικειμενοφόροι πλάκες μικροσκοπίου με 10 κατά προτίμηση φατνία διαμέτρου τουλάχιστον 6 mm.

Η δοκιμή του υλικού των μαρτύρων γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως αυτή του ή των δειγμάτων.

5.1. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες δοκιμής προετοιμάζονται με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

i) Για ιζήματα με μικρή σχετικά ποσότητα ιζήματος αμύλου:

Στο πρώτο φατνίο, φέρεται μετρημένος με σιφώνιο συγκεκριμένος όγκος (15 μl είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6 mm - ο όγκος κλιμακώνεται προς τα άνω για μεγαλύτερα φατνία) αραίωσης 1/100 του αιωρήματος του ιζήματος πατάτας. Στη συνέχεια, φέρεται με σιφώνιο όμοιος όγκος μη αραιωμένου ιζήματος (1/1) στα υπόλοιπα φατνία διαδοχικά. Η δεύτερη σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα εις διπλούν ή για ένα δεύτερο δείγμα όπως φαίνεται στην εικόνα 1.

ii) Για άλλα ιζήματα:

Παρασκευάζονται δεκαδικές αραιώσεις (1/10 και 1/100) του αιωρήματος του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος. Σε μία σειρά φατνίων, φέρεται μετρημένος με σιφώνιο συγκεκριμένος όγκος (15 μl είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6 mm - ο όγκος κλιμακώνεται προς τα άνω για μεγαλύτερα φατνία) του αιωρήματος του ιζήματος και κάθε αραίωση. Η δεύτερη σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επανάληψη του δείγματος ή για ένα δεύτερο δείγμα όπως φαίνεται στην εικόνα 2.

5.2. Τα σταγονίδια στεγνώνονται σε θερμοκρασία εργαστηρίου ή με θέρμανση σε θερμοκρασίες 40 έως 45 °C. Τα βακτηριακά κύτταρα προσηλώνονται στην αντικειμενοφόρο με θέρμανση (15 λεπτά στους 60 °C),

με φλόγα, με 95 % αιθανόλη ή σύμφωνα με τις συγκεκριμένες οδηγίες των προμηθευτών των αντισωμάτων.

Εάν είναι απαραίτητο, οι προσηλωμένες αντικειμενοφόροι είναι δυνατόν να φυλαχθούν στη συνέχεια στην κατάψυξη σε αφυδατωμένο δοχείο για όσο το δυνατόν μικρότερο χρονικό διάστημα (το μέγιστο για 3 μήνες) προτού υποβληθούν σε περαιτέρω δοκιμές.

5.3. Διαδικασία IF

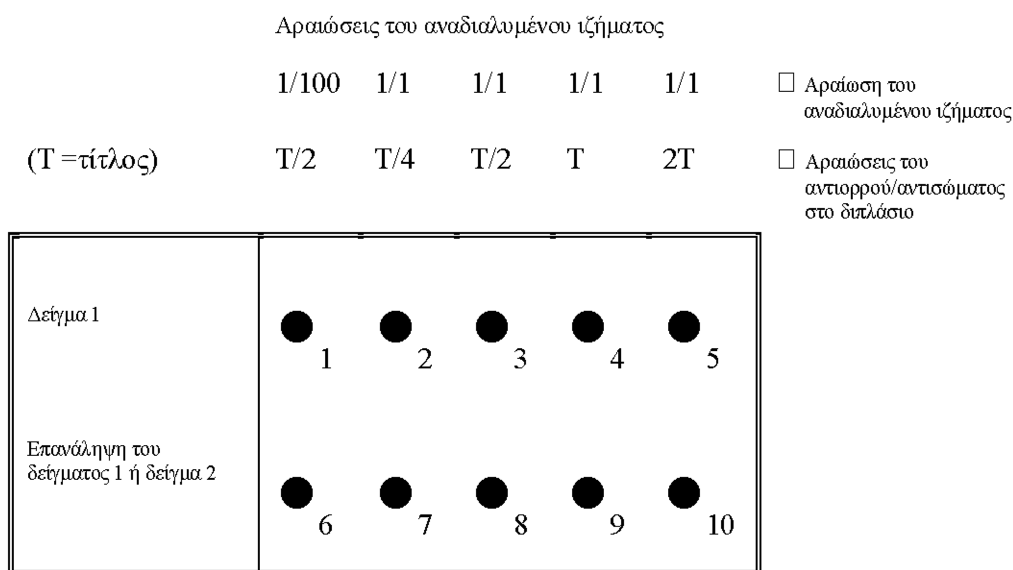
i) Σύμφωνα με την προετοιμασία της αντικειμενοφόρου δοκιμής στο σημείο 5.1.i):

Παρασκευάζεται μία σειρά αραιώσεων στο διπλάσιο. Το πρώτο φατνίο πρέπει να έχει ½ του τίτλου (Τ/2), τα υπόλοιπα Ό του τίτλου (Τ/4), ½ του τίτλου (Τ/2), τον τίτλο (Τ) και το διπλάσιο του τίτλου (2Τ).

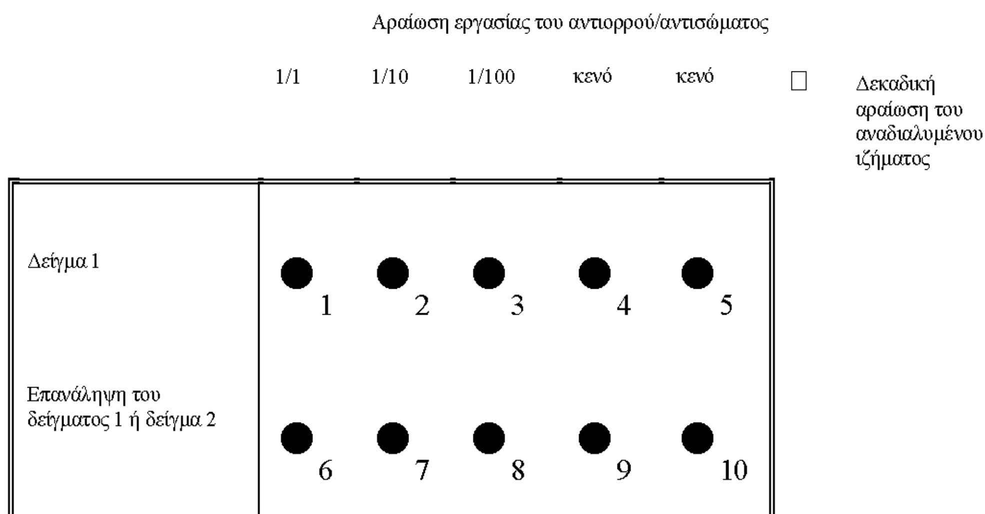
ii) Σύμφωνα με την ετοιμασία της αντικειμενοφόρου προς δοκιμή στο σημείο 5.1.ii):

Παρασκευάζεται η αραίωση εργασίας (WD) του αντισώματος σε ρυθμιστικό διάλυμα για IF. Η αραίωση εργασίας επηρεάζει την εξειδίκευση.

Εικόνα 1. Προετοιμασία της αντικειμενοφόρου δοκιμής σύμφωνα με τα σημεία 5.1.i) και 5.3.i)



Εικόνα 2. Προετοιμασία της αντικειμενοφόρου δοκιμής σύμφωνα με τα σημεία 5.1.ii) και 5.3.ii).



5.3.1. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες διευθετούνται πάνω σε ένυγρο απορροφητικό χαρτί. Κάθε φατνίο δοκιμής καλύπτεται πλήρως με την ή τις αραιώσεις αντισώματος. Ο όγκος του αντισώματος που εφαρμόζεται σε κάθε φατνίο πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσος με τον όγκο του εφαρμοσθέντος εκχυλίσματος.

Η ακόλουθη διαδικασία πρέπει να εφαρμόζεται στην περίπτωση που δεν υπάρχουν συγκεκριμένες οδηγίες από τους προμηθευτές των αντισωμάτων:

5.3.2. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες επωάζονται σε ένυγρο χαρτί κάτω από ένα κάλυμμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία εργαστηρίου (18-25 ^{0}C).

5.3.3. Τα σταγονίδια απομακρύνονται με ένα ελαφρό τίναγμα από την αντικειμενοφόρο και ακολουθεί προσεκτικό ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα IF. Πλένονται με βύθισμα για 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα IF-Tween (προσάρτημα 4) και στη συνέχεια σε ρυθμιστικό διάλυμα IF. Πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία αερολυμάτων ή η μεταφορά σταγονιδίων που θα μπορούσαν να έχουν ως αποτέλεσμα την επιμόλυνση. Η περίσσεια υγρασίας αφαιρείται προσεκτικά χρησιμοποιώντας με απαλές κινήσεις ένα στυπόχαρτο.

5.3.4. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες διευθετούνται πάνω σε ένυγρο χαρτί. Τα φατνία δοκιμής καλύπτονται με την αραίωση του συμπλόκου FITC που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του τίτλου. Ο όγκος του χρησιμοποιούμενου στα φατνία συμπλόκου πρέπει να είναι ίδιος με τον όγκο του εφαρμοσθέντος αντισώματος.

5.3.5. Οι αντικειμενοφόροι επωάζονται σε ένυγρο χαρτί κάτω από ένα κάλυμμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία εργαστηρίου (18-25 ^{0}C).

5.3.6. Τα σταγονίδια του συμπλόκου απομακρύνονται με ελαφρό τίναγμα από την αντικειμενοφόρο. Οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται και πλένονται όπως προηγουμένως (5.3.3).

Η περίσσεια υγρασίας αφαιρείται προσεκτικά.

5.3.7. Σε κάθε φατνίο φέρονται με σιφώνιο 5-10 μl 0,1M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος γλυκερίνης (προσάρτημα 4) ή εμπορικού αντιξεθωριαστικού υλικού έγκλεισης και τα φατνία καλύπτονται με μία καλυπτρίδα.

5.4. Ανάγνωση της δοκιμής IF

5.4.1. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες δοκιμής εξετάζονται σε μικροσκόπιο επιφθορισμού με φίλτρα κατάλληλα για τη διέγερση του FITC, με ελαιο- ή υδατοκαταδυτικό φακό σε μεγέθυνση 500-1000 x. Τα φατνία εξετάζονται κατά δύο κάθετες διαμέτρους και κατά την περίμετρό τους. Όσον αφορά τα δείγματα που δεν δείχνουν καθόλου κύτταρα ή δείχνουν μικρό αριθμό κυττάρων, πρέπει να παρατηρηθούν τουλάχιστον 40 πεδία μικροσκοπίου.

Πρώτα ελέγχεται η αντικειμενοφόρος του θετικού μάρτυρα. Τα κύτταρα πρέπει να είναι πλήρως χρωσμένα με λαμπρό φθορισμό στον προσδιορισμένο τίτλο αντισώματος ή την αραίωση εργασίας. Σε περίπτωση παρέκκλισης της χρώσης, η δοκιμή IF (ενότητα VI.A.5.) επαναλαμβάνεται.

5.4.2. Εξετάζεται εάν υπάρχουν λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με τη χαρακτηριστική μορφολογία του R. solanacearum στα φατνία δοκιμής των αντικειμενοφόρων πλακών δοκιμής (βλ. ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Η ένταση του φθορισμού πρέπει να είναι ισοδύναμη με εκείνη του θετικού μάρτυρα με ίδια αραίωση αντισώματος. Κύτταρα με ατελή χρώση ή με ασθενή φθορισμό δεν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

Εάν υπάρχει υποψία μόλυνσης, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί. Κάτι τέτοιο υπάρχει περίπτωση να συμβεί εάν όλες οι αντικειμενοφόροι μιας παρτίδας δείχνουν θετικά κύτταρα λόγω μόλυνσης του ρυθμιστικού διαλύματος ή εάν βρεθούν θετικά κύτταρα (εκτός των φατνίων της αντικειμενοφόρου) στην επικάλυψη της αντικειμενοφόρου.

5.4.3. Υπάρχουν διάφορα προβλήματα σύμφυτα με την εξειδίκευση της δοκιμής ανοσοφθορισμού. Τα ιζήματα των κώνων από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου και των τμημάτων των στελεχών περιέχουν συχνά πληθυσμούς φθοριζόντων κυττάρων μη τυπικής μορφολογίας καθώς και μη ειδικώς αντιδρώντα σαπροφυτικά βακτήρια όμοιου μεγέθους και μορφολογίας με το R. solanacearum.

5.4.4. Λαμβάνονται υπόψη μόνον τα φθορίζοντα κύτταρα με τυπικό μέγεθος και μορφολογία στον τίτλο ή την αραίωση εργασίας των αντισωμάτων όπως στο σημείο 5.3.

5.4.5. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων IF:

i) Εάν βρίσκονται λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία, εκτιμάται ο μέσος αριθμός τυπικών κυττάρων ανά πεδίο μικροσκοπίου και υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών κυττάρων ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος (προσάρτημα 5).

Η ανάγνωση IF είναι θετική για δείγματα με τουλάχιστον $5x10^3$ τυπικά κύτταρα ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος. Το δείγμα θεωρείται ενδεχομένως μολυσμένο και απαιτείται η διενέργεια περαιτέρω δοκιμών.

ii) Η ανάγνωση IF είναι αρνητική για δείγματα με λιγότερα από $5x10^3$ κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος και το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Δεν απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών.

6. Δοκιμές PCR

Αρχές

Όταν η δοκιμή PCR χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής και έχει θετικά αποτελέσματα, πρέπει να πραγματοποιηθεί η απομόνωση ή IF ως δεύτερη υποχρεωτική δοκιμή διαλογής. Όταν η δοκιμή PCR χρησιμοποιείται ως δεύτερη δοκιμή διαλογής και έχει θετικά αποτελέσματα, απαιτείται διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών σύμφωνα με το διάγραμμα ροής για την ολοκλήρωση της διάγνωσης.

Η πλήρης αξιοποίηση της μεθόδου αυτής ως αρχικής δοκιμής διαλογής συνιστάται μόνον όταν έχει αποκτηθεί εξειδικευμένη εμπειρία.

Σημείωση: Οι προκαταρκτικές δοκιμές με τη μέθοδο αυτή πρέπει να επιτρέπουν την αναπαραγώγιμη ανίχνευση τουλάχιστον 10^3 έως 10^4 κυττάρων του R. solanacearum ανά ml που προστίθεται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που προηγούμενως έδειξαν αρνητικά αποτελέσματα. Μπορεί να χρειασθούν πειράματα αριστοποίησης για την επίτευξη των μέγιστων επιπέδων ευαισθησίας και εξειδίκευσης σε όλα τα εργαστήρια.

Χρησιμοποιούνται επικυρωμένα αντιδραστήρια και πρωτόκολλα PCR (βλέπε προσάρτημα 6). Επιλέγεται κατά προτίμηση μέθοδος με εσωτερικό μάρτυρα.

Λαμβάνονται οι κατάλληλες προφυλάξεις ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση του δείγματος με DNA στόχο. Η δοκιμή PCR θα πρέπει να πραγματοποιείται από πε-

πειραμένους τεχνικούς, σε καθιερωμένα εργαστήρια μοριακής βιολογίας, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα μόλυνσης με DNA στόχο.

Οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει πάντοτε (εξαγωγή DNA και PCR) να χειρίζονται ως τελικό δείγμα στη διαδικασία, έτσι ώστε να καθίσταται φανερή ενδεχόμενη μεταφορά DNA.

Στη δοκιμή PCR πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι αρνητικοί μάρτυρες:

- εκχύλισμα δείγματος που προηγουμένως ήταν αρνητικό στη δοκιμή για το R. solanacearum,
- μάρτυρες ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του βακτηρίου και του DNA από το δείγμα,
- μείγμα αντίδρασης PCR.

Πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι θετικοί μάρτυρες:

- κατάλληλες ποσότητες αναδιαλυμένων ιζημάτων στις οποίες έχει προστεθεί το R. solanacearum (για την παρασκευή βλέπε προσάρτημα 3 Β),
- αιώρημα 106 κυττάρων ανά ml νερού παθογόνου απομόνωσης του R. solanacearum (π.χ. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857· βλέπε προσάρτημα 3 Β),
- εάν είναι δυνατόν, χρησιμοποιείται επίσης DNA από δείγματα θετικών μαρτύρων κατά τη διενέργεια της PCR.

Για την αποφυγή πιθανής μόλυνσης παρασκευάζονται θετικοί μάρτυρες σε ξεχωριστό περιβάλλον από τα δείγματα προς δοκιμή.

Τα εκχυλίσματα δείγματος πρέπει να έχουν απαλλαγεί στο μέγιστο δυνατό βαθμό από χώματα. Για το λόγο αυτό, συστήνεται σε ορισμένες περιπτώσεις να προετοιμάζονται οι εξαγωγές από πλυμένες πατάτες εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν πρωτόκολλα PCR.

Στο προσάρτημα 3 παρατίθενται τυποποιημένα υλικά θετικών και αρνητικών μαρτύρων που διατίθενται προς χρήση στο πλαίσιο της εν λόγω δοκιμής.

6.1. Μέθοδοι καθαρισμού DNA

Χρησιμοποιούνται δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλέπε προσάρτημα 3).

Η δοκιμή του υλικού των μαρτύρων γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως αυτή του ή των δειγμάτων.

Υπάρχουν διάφορες διαθέσιμες μέθοδοι για τον καθαρισμό του DNA στόχου από σύνθετα υποστρώματα δειγμάτων, απομακρύνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τους παρεμποδιστές της PCR και άλλων ενζυματικών αντιδράσεων και συγκεντρώνοντας το DNA στόχο στο εκχύλισμα δείγματος. Η ακόλουθη μέθοδος έχει βελτιστοποιηθεί με σκοπό τη χρήση με τις επικυρωμένες μεθόδους PCR που περιγράφονται στο προσάρτημα 6.

α) Μέθοδος Pastrik (2000)

1. Προστίθενται με σιφώνιο 220 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]) σε σωλήνα Eppendorf 1,5 ml.

2. Προστίθενται 100 μl εκχυλίσματος δείγματος και τοποθετούνται σε θερμικό μπλοκ ή υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C για 10 λεπτά.

3. Ο σωλήνας τοποθετείται σε πάγο για 5 λεπτά.

4. Προστίθενται 80 μl πυκνού διαλύματος λυσοζύμης (50 mg λυσοζύμη ανά ml σε 10 mM Tris HCl, pH 8.0) και επωάζονται στους 37 °C για 30 λεπτά.

5. Προστίθενται 220 μl διαλύματος A Easy DNA® (Invitrogen), αναμειγνύονται καλά σε συσκευή vortex και επωάζονται στους 65 °C για 30 λεπτά.

6. Προστίθενται 100 μl διαλύματος B Easy DNA® (Invitrogen), αναμειγνύονται με ένταση σε συσκευή vortex έως ότου το ίζημα να ρέει ελεύθερα στο σωλήνα και το δείγμα να είναι ομοιόμορφα ιξώδες.

7. Προστίθενται 500 μl χλωροφορμίου και αναμειγνύουμε με στροβιλισμό (vortex) έως ότου μειωθεί το ιξώδες και το μείγμα είναι ομοιογενές.

8. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 15.000 g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C για το διαχωρισμό των φάσεων και τη δημιουργία της ενδιάμεσης φάσης.

9. Η άνω φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα Eppendorf.

10. Προστίθεται 1 ml από 100% αιθανόλη (-20 °C), αναμειγνύεται με στροβιλισμό (vortex) για σύντομο χρονικό διάστημα και επωάζεται σε πάγο για 10 λεπτά.

11. Φυγοκεντρείται σε 15000 g για 20 λεπτά στους 4°C και απομακρύνεται η αιθανόλη από το ίζημα.

12. Προστίθενται 500 μl 80% αιθανόλης (-20 °C) και αναμειγνύουμε αναποδογυρίζοντας το σωλήνα.

13. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 15000 g για 10 λεπτά στους 4 °C, διατηρείται το ίζημα και απομακρύνεται η αιθανόλη.

14. Αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει στον αέρα ή σε DNA Speed Vac.

15. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 100 μl αποστειρωμένου UPW και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά.

16. Αποθηκεύεται στους -20 °C έως ότου χρειασθεί να χρησιμοποιηθεί για την PCR.

17. Καθιζάνεται με φυγοκέντριση οιοδήποτε λευκό ίζημα και χρησιμοποιούνται 5 μl του υπερκείμενου υγρού που περιέχει DNA για την PCR.

β) Άλλες μέθοδοι

Είναι δυνατόν να εφαρμοσθούν άλλες μέθοδοι εξαγωγής DNA (π.χ. Qiagen DNeasy Plant Kit) υπό την προϋπόθεση ότι έχει αποδειχθεί πως είναι εξίσου αποτελεσματικές για τον καθαρισμό DNA από δείγματα μαρτύρων που περιέχουν 103 έως 104 κύτταρα παθογόνου ανά ml.

6.2. PCR

6.2.1. Τα προς δοκιμή πρότυπα και εκείνα των μαρτύρων παρασκευάζονται για την PCR σύμφωνα με τα επικυρωμένα πρωτόκολλα (ενότητα VI.A.6.). Παρασκευάζεται μία δεκαδική αραίωση εκχυλίσματος DNA δείγματος (1:10 σε UPW).

6.2.2. Παρασκευάζεται το κατάλληλο μείγμα αντίδρασης PCR σε περιβάλλον απαλλαγμένο από μολύνσεις σύμφωνα με τα δημοσιευμένα πρωτόκολλα (προσάρτημα 6). Στις περιπτώσεις που κάτι τέτοιο είναι δυνατόν, συνιστάται η χρήση πρωτοκόλλου πολλαπλής PCR που περιλαμβάνει επίσης εσωτερικό μάρτυρα PCR.

6.2.3. Προσθέτουμε 2-5 μl εκχυλίσματος DNA ανά 25 μl αντίδρασης PCR σε αποστειρωμένους σωλήνες PCR σύμφωνα με τα πρωτόκολλα PCR (βλέπε προσάρτημα 6).

6.2.4. Ενσωματώνεται δείγμα αρνητικού μάρτυρα που περιέχει μόνον μείγμα αντίδρασης PCR και προστίθεται η ίδια πηγή UPW που χρησιμοποιήθηκε στο μείγμα PCR αντί για δείγμα.

6.2.5. Οι σωλήνες τοποθετούνται στον ίδιο θερμικό κυκλοποιητή που χρησιμοποιήθηκε στην προκαταρκτική

δοκιμή και αρχίζει το καταλλήλως βελτιστοποιημένο πρόγραμμα PCR (προσάρτημα 6).

6.3. Ανάλυση του προϊόντος PCR

6.3.1. Τα αμπλικόνια της PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Τοποθετούνται για μετακίνηση τουλάχιστον 12 μl ενισχυμένου σε DNA μείγματος αντίδρασης από κάθε δείγμα αναμεμειγμένα με 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (προσάρτημα 6) σε 2,0% (β/ο) πηκτές αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα tris-acetate-EDTA (TAE) (προσάρτημα 6) σε 5-8 V ανά cm. Χρησιμοποιείται ένας κατάλληλος δείκτης μοριακών βαρών DNA, π.χ. 100 bp ladder.

6.3.2. Οι ζώνες DNA αποκαλύπτονται διά χρώσεως σε βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 mg ανά L) για 30-60 λεπτά λαμβάνοντας τις απαραίτητες προφυλάξεις κατά το χειρισμό αυτού του μεταλλαξιογόνου.

6.3.3. Η χρωσμένη πηκτή εξετάζεται υπό υπεριώδη ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος (π.χ. λ = 302 nm) για ενισχυμένα προϊόντα PCR του αναμενόμενου μεγέθους (προσάρτημα 6) και σημειώνονται τα αποτελέσματα.

6.3.4. Για όλα τα νέα ευρήματα/περιπτώσεις, επιβεβαιώνεται η αυθεντικότητα του αμπλικονίου PCR με την πραγματοποίηση ανάλυσης με ένζυμο περιορισμού σε δείγμα του εναπομείναντος ενισχυμένου DNA με επώαση στη βέλτιστη θερμοκρασία και χρόνο με το κατάλληλο ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα (βλέπε προσάρτημα 6). Τα τμήματα που υπέστησαν πέψη αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπως προηγουμένως και παρατηρείται υπό υπεριώδη ακτινοβολία το χαρακτηριστικό πρότυπο του θραύσματος περιορισμού μετά τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και συγκρίνεται με το θετικό μάρτυρα που δεν υπέστη πέψη και το θετικό μάρτυρα που υπέστη πέψη.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής PCR:

Η δοκιμή PCR είναι αρνητική εάν το ειδικό για το R. solanacearum αμπλικόνιο PCR του αναμενομένου μεγέθους, δεν ανιχνευθεί για το εν λόγω δείγμα αλλά ανιχνευθεί για όλα τα δείγματα θετικών μαρτύρων (στην περίπτωση πολλαπλής PCR με εκκινητές εσωτερικών μαρτύρων ειδικούς για φυτά: πρέπει να ενισχυθεί ένα δεύτερο, αναμενόμενου μεγέθους, προϊόν PCR με το εν λόγω δείγμα).

Η δοκιμή PCR είναι θετική εάν ανιχνευθεί το ειδικό για το R. solanacearum αμπλικόνιο της PCR στο αναμενόμενο μέγεθος και πρότυπο περιορισμού (όταν αυτό απαιτείται), εφόσον δεν έχει ενισχυθεί από οιοδήποτε εκ των δειγμάτων αρνητικών μαρτύρων. Η αξιόπιστη επιβεβαίωση τυχόν θετικού αποτελέσματος είναι δυνατόν να επιτευχθεί επίσης με την επανάληψη της δοκιμής με δεύτερο σετ εκκινητών PCR (προσάρτημα 6).

Σημείωση: Ενδέχεται να υπάρξουν υπόνοιες για παρεμπόδιση της PCR εάν το αναμενόμενο αμπλικόνιο αποκτηθεί από δείγμα θετικού μάρτυρα που περιέχει R. solanacearum σε ύδωρ αλλά προκύψουν αρνητικά αποτελέσματα από τους θετικούς μάρτυρες με R. solanacearum σε εκχύλισμα πατάτας. Στα πρωτόκολλα πολλαπλής PCR με εσωτερικούς μάρτυρες PCR, υπάρχει ένδειξη για παρεμπόδιση της αντίδρασης εάν δεν προκύψει κανένα από τα δύο αμπλικόνια.

Υπάρχει υπόνοια για επιμόλυνση εάν το αναμενόμενο αμπλικόνιο προκύψει από έναν ή περισσότερους αρνητικούς μάρτυρες.

7. Δοκιμή FISH

Αρχή

Όταν η δοκιμή FISH χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής και τα αποτελέσματα είναι θετικά, πρέπει να πραγματοποιηθεί η δοκιμή απομόνωσης ή IF ως δεύτερη υποχρεωτική δοκιμή διαλογής. Όταν η δοκιμή FISH χρησιμοποιείται ως δεύτερη δοκιμή διαλογής και έχει θετικά αποτελέσματα, απαιτείται διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών σύμφωνα με το διάγραμμα ροής για την ολοκλήρωση της διάγνωσης.

Σημείωση: Χρησιμοποιούνται επικυρωμένοι ολιγοανιχνευτές ειδικοί για το R. solanacearum (βλέπε προσάρτημα 7). Οι προκαταρκτικές δοκιμές με τη μέθοδο αυτή θα πρέπει να επιτρέπουν την αναπαραγώγιμη ανίχνευση τουλάχιστον 10^3-10^4 κυττάρων R. solanacearum ανά ml που προστίθενται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που προηγούμενως ήταν αρνητικά στη δοκιμή.

Η ακόλουθη διαδικασία είναι προτιμότερο να πραγματοποιείται σε εκχύλισμα δείγματος που έχει μόλις παρασκευασθεί αλλά είναι επίσης δυνατόν να πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε εκχύλισμα δείγματος που έχει αποθηκευθεί με γλυκερίνη στους -16 έως -24 ^{0}C ή τους -68 έως -86 ^{0}C.

Ως αρνητικοί μάρτυρες, χρησιμοποιούνται κατάλληλες ποσότητες εκχυλίσματος δείγματος που προηγουμένως ήταν αρνητικό στις δοκιμές όσον αφορά το R. solanacearum.

Ως θετικοί μάρτυρες, παρασκευάζονται αιωρήματα που περιέχουν 10^5 έως 10^6 κύτταρα ανά ml του R. solanacearum βιοποικιλία 2 (π.χ. στέλεχος NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, βλέπε προσάρτημα 3) σε 0,01M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PB) από καλλιέργεια 3-5 ημερών. Παρασκευάζονται ξεχωριστά ως θετικοί μάρτυρες αντικειμενοφόροι πλάκες από ομόλογο στέλεχος ή άλλο στέλεχος αναφοράς του R. solanacearum, που έχει γίνει αιώρημα σε εκχύλισμα πατάτας, όπως περιγράφεται στο προσάρτημα 3.

Η χρήση ολιγοανιχνευτή ευβακτηρίων σημασμένου με FITC παρέχει μάρτυρα για τη διαδικασία υβριδισμού, καθώς χρωματίζει όλα τα ευβακτήρια που βρίσκονται στο δείγμα.

Στο προσάρτημα 3 A παρατίθενται τυποποιημένα υλικά θετικών και αρνητικών μαρτύρων που διατίθενται προς χρήση με αυτή τη δοκιμή.

Το υλικό των μαρτύρων δοκιμάζεται με τρόπο ταυτόσημο με εκείνο του ή των δειγμάτων.

7.1. Προσήλωση του εκχυλίσματος πατάτας

Το ακόλουθο πρωτόκολλο βασίζεται στον Wullings et al., (1998):

7.1.1. Παρασκευάζεται το προσηλωτικό διάλυμα (βλέπε προσάρτημα 7).

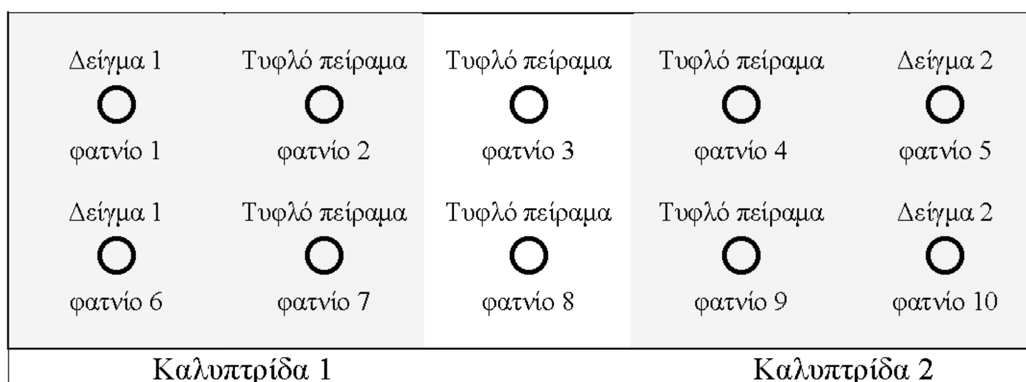
7.1.2. Φέρονται με σιφώνιο 100 μl κάθε εκχυλίσματος δείγματος σε σωλήνα Eppendorf και φυγοκεντρούνται για 7 λεπτά σε 7000 g.

7.1.3. Αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα διαλύεται σε 200 μl προσηλωτικού υγρού που έχει παρασκευασθεί λιγότερο από 24 ώρες πριν. Αναταράσσουμε με στροβιλισμό (vortex) και επωάζουμε για 1 ώρα στο ψυγείο.

7.1.4. Φυγοκεντρείται για 7 λεπτά σε 7000 g, αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα αναδιαλύεται σε 75 μl 0,01M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PB) (βλέπε προσάρτημα 7).

7.1.5. Τοποθετούνται κατά κηλίδες 16 μl των προσηλωμένων αιωρημάτων σε καθαρή αντικειμενοφόρο πολλαπλών δοκιμών όπως φαίνεται στην Εικόνα 7.1. Εφαρμόζονται 2 διαφορετικά, μη αραιωμένα, δείγματα ανά αντικειμενοφόρο και χρησιμοποιούνται 10 μl για τη δημιουργία αραίωσης 1:100 (σε 0,01 Μ ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών). Το εναπομείναν διάλυμα δείγματος (49 μl) μπορεί να αποθηκευθεί στους - 20°C μετά την προσθήκη 1 όγκου 96% αιθανόλης. Στην περίπτωση που η δοκιμή FISH πρέπει να επαναληφθεί, αφαιρείται η αιθανόλη με φυγοκέντριση και προστίθεται ίσος όγκος 0,01 Μ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών [αναμειγνύουμε με στροβιλισμό (vortex)].

Εικόνα 7.1: Σχέδιο αντικειμενοφόρου FISH



7.1.6. Οι αντικειμενοφόροι στεγνώνουν στον αέρα (ή σε στεγνωτήρα αντικειμενοφόρου στους 37 °C) και προσηλώνονται με διέλευση από φλόγα.

Στο στάδιο αυτό, η διαδικασία είναι δυνατόν να διακοπεί και να συνεχισθεί ο υβριδισμός την επόμενη ημέρα. Οι αντικειμενοφόροι πρέπει να αποθηκεύονται απαλλαγμένες από σκόνη και στεγνές σε θερμοκρασία δωματίου.

7.2. Υβριδισμός

7.2.1. Τα κύτταρα αφυδατώνονται σε διαβαθμισμένη σειρά αιθανόλης των 50%, 80% και 96% για ένα λεπτό σε κάθε μία. Οι αντικειμενοφόροι στεγνώνονται στον αέρα σε υποδοχέα αντικειμενοφόρων.

7.2.2. Παρασκευάζεται ένας υγρός θάλαμος επώασης με κάλυψη του πυθμένα ενός αεροστεγούς δοχείου με απορροφητικό ή διηθητικό χαρτί που έχει εμβαπτισθεί σε 1x μείγμα υβριδισμού (hybmix) (προσάρτημα 7). Το δοχείο προεπωάζεται στον κλίβανο υβριδισμού στους 45 °C για τουλάχιστον 10 λεπτά.

7.2.3. Εφαρμόζουμε 10 μl διαλύματος υβριδισμού (προσάρτημα 7) σε 8 φατνία (φατνία 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 και 10·βλέπε Εικόνα 7.1) κάθε αντικειμενοφόρου αφήνοντας τα δύο φατνία στο κέντρο (3 και 8) κενά.

7.2.4. Εφαρμόζουμε καλυπτρίδες (24 x 24 mm) στα πρώτα και στα 4 τελευταία φατνία χωρίς να εγκλωβιστεί αέρας. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται σε προθερμασμένο υγρό θάλαμο και ο υβριδισμός πραγματοποιείται για 5 ώρες στον κλίβανο σε θερμοκρασία 45 °C στο σκοτάδι.

7.2.5. Παρασκευάζονται 3 ποτήρια ζέσεως που περιέχουν αντίστοιχα 1 l νερό Milli Q (νερό μοριακού βαθμού καθαρότητας), 1 l από 1x hybmix (334 ml 3x hybmix και 666 ml νερό Milli Q) και 1 l από 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix και 958 ml νερό Milli Q). Έκαστο προεπωάζεται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 45 °C.

7.2.6. Απομακρύνονται οι καλυπτρίδες από τις αντικειμενοφόρους πλάκες και οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνται στον υποδοχέα αντικειμενοφόρων.

7.2.7. Ξεπλένεται η περίσσεια ανιχνευτού με επώαση για 15 λεπτά σε ποτήρι ζέσεως με 1x hybmix στους 45 °C.

7.2.8. Ο υποδοχέας αντικειμενοφόρων πλακών μεταφέρεται σε διάλυμα πλυσίματος 1/8 hybmix και επωάζουμε για 15 λεπτά ακόμη.

7.2.9. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες βυθίζονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε νερό Milli Q και τοποθετούνται σε διηθητικό χαρτί. Η περίσσεια υγρασίας απομακρύνεται καλύπτοντας την επιφάνεια απαλά με διηθητικό χαρτί. Προστίθενται με σιφώνιο 5-10 μl αντιξεθωριαστικού διαλύματος έγκλεισης (e.g. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ή ισοδύναμα) σε κάθε φατνίο και εφαρμόζεται μεγάλη καλυπτρίδα (24 x 60 mm) σε ολόκληρη την αντικειμενοφόρο πλάκα.

7.3. Ανάγνωση της δοκιμής FISH

7.3.1. Εξετάζονται οι αντικειμενοφόροι πλάκες αμέσως με μικροσκόπιο προσαρμοσμένο για μικροσκοπία επιφθορισμού σε μεγέθυνση 630 ή 1000x με έλαιο κατάδυσης. Με φίλτρο κατάλληλο για ισοθειοκυανική φθορεϊσίνη (FITC), τα ευβακτηριακά κύτταρα (συμπεριλαμβανομένων των περισσοτέρων αρνητικών κατά Gram κυττάρων) στο δείγμα είναι χρωσμένα πράσινα φθορίζοντα. Εάν χρησιμοποιηθεί φίλτρο 5-ισοθειοκυανικής τετραμεθυλοροδαμίνης, τα κύτταρα του R. solanacearum που έχουν χρωσθεί με Cy3 εμφανίζονται φθορίζοντα κόκκινα. Συγκρίνεται η μορφολογία των κυττάρων με αυτή των θετικών μαρτύρων. Τα κύτταρα πρέπει να είναι πλήρως χρωσμένα με λαμπρό φθορισμό. Η δοκιμή FISH (ενότητα VI.A.7.) πρέπει να επαναληφθεί αν η χρώση παρεκκλίνει. Τα φατνία εξετάζονται κατά δύο κάθετες διαμέτρους και στην περίμετρό τους. Όσον αφορά τα δείγματα που δεν δείχνουν καθόλου κύτταρα ή δείχνουν μικρό αριθμό κυττάρων, πρέπει να παρατηρηθούν τουλάχιστον 40 πεδία μικροσκοπίου.

7.3.2. Εξετάζεται εάν υπάρχουν λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με τη χαρακτηριστική μορφολογία του R. solanacearum στα φατνία δοκιμής των αντικειμε-

νοφόρων δοκιμής (βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/ main). Η ένταση του φθορισμού πρέπει να είναι ισοδύναμη ή καλύτερη από αυτήν της χρώσης των θετικών μαρτύρων. Κύτταρα με ατελή χρώση ή με ασθενή φθορισμό δεν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

7.3.3. Εάν υπάρχει υπόνοια μόλυνσης, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί. Αυτό μπορεί να ισχύει εάν όλες οι αντικειμενοφόροι μιας παρτίδας δείχνουν θετικά κύτταρα λόγω μόλυνσης του ρυθμιστικού διαλύματος ή εάν βρεθούν θετικά κύτταρα (εκτός των φατνίων της αντικειμενοφόρου) στην επικάλυψη της αντικειμενοφόρου.

7.3.4. Υπάρχουν διάφορα προβλήματα σύμφυτα με την εξειδίκευση της δοκιμής FISH. Τα ιζήματα των κώνων από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου και των τμημάτων των στελεχών ενδέχεται να περιέχουν, αν και πολύ λιγότερο συχνά από τη δοκιμή IF, πληθυσμούς φθοριζόντων κυττάρων μη τυπικής μορφολογίας καθώς και μη ειδικώς αντιδρώντα σαπροφυτικά βακτήρια όμοιου μεγέθους και μορφολογίας με το R. solanacearum.

7.3.5. Λαμβάνονται υπόψη μόνον τα φθορίζοντα κύτταρα με τυπικό μέγεθος και μορφολογία.

7.3.6. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής FISH:

i) Έγκυρα αποτελέσματα από τη δοκιμή FISH παρέχονται όταν, χρησιμοποιώντας φίλτρο FITC, παρατηρούνται κύτταρα που είναι χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον πράσινο χρώμα και διαθέτουν το τυπικό μέγεθος και μορφολογία του R. solanacearum και, όταν, χρησιμοποιώντας φίλτρο ροδαμίνης, παρατηρούνται κύτταρα χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον κόκκινο χρώμα σε όλους τους θετικούς μάρτυρες και σε κανέναν αρνητικό μάρτυρα. Εάν σε ένα δείγμα εντοπίζονται λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία, εκτιμάται ο μέσος αριθμός τυπικών κυττάρων ανά πεδίο μικροσκοπίου και υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών κυττάρων ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος (προσάρτημα 4). Τα δείγματα με τουλάχιστον $5x10^3$ τυπικά κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος θεωρούνται ενδεχομένως μολυσμένα. Απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών. Τα δείγματα με λιγότερα από $5x10^3$ τυπικά κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος θεωρούνται αρνητικά.

ii) Η δοκιμή FISH είναι αρνητική εάν κύτταρα χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον κόκκινο χρώμα, τα οποία έχουν το τυπικό μέγεθος και μορφολογία του R. solanacearum, δεν παρατηρούνται με φίλτρο ροδαμίνης, υπό την προϋπόθεση ότι τυπικά κύτταρα χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον κόκκινο χρώμα παρατηρούνται στα παρασκευάσματα θετικών μαρτύρων όταν χρησιμοποιείται φίλτρο ροδαμίνης.

8. Δοκιμες ELISA

Αρχή

Η δοκιμή ELISA είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί μόνον ως προαιρετική δοκιμή επιπροσθέτως προς τις δοκιμές IF, PCR ή FISH λόγω της σχετικά χαμηλής ευαισθησίας της δοκιμής αυτής. Όταν χρησιμοποιείται η DAS ELISA, είναι υποχρεωτικός ο εμπλουτισμός και η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Ο εμπλουτισμός των δειγμάτων πριν από τη χρήση της δοκιμής ELISA ενδέχεται να χρησιμεύσει για την ενίσχυση της ευαισθησίας της δοκιμής, αλλά μπορεί να αποτύχει λόγω ανταγωνισμού από άλλους οργανισμούς στο δείγμα.

Σημείωση: Χρησιμοποιούμε επικυρωμένη πηγή αντισωμάτων του R. Solanacearum (βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/ irc/sanco/Home/main). Συνιστάται ο προσδιορισμός του τίτλου για κάθε νέα παρτίδα αντισωμάτων. Ως τίτλος ορίζεται η μεγαλύτερη αραίωση στην οποία λαμβάνει χώρα η βέλτιστη αντίδραση όταν υποβάλλεται σε δοκιμή αιώρημα που περιέχει 10^5 έως 10^6 κύτταρα ανά ml του ομόλογου στελέχους του R. solanacearum και χρησιμοποιείται κατάλληλο δευτερεύον σύμπλοκο αντισωμάτων σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, τα αντισώματα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε αραίωση εργασίας στον τίτλο ή κοντά στον τίτλο του εμπορικού σκευάσματος.

Προσδιορίζουμε τον τίτλο των αντισωμάτων σε αιώρημα 10^5 έως 10^6 κυττάρων ανά ml ομόλογου στελέχους του R. solanacearum.

Περιλαμβάνουμε εκχύλισμα δείγματος που προηγουμένως ήταν αρνητικό στις δοκιμές όσον αφορά το R. solanacearum και αιώρημα ενός μη ειδικώς αντιδρώντος βακτηρίου σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS) ως αρνητικούς μάρτυρες.

Ως θετικό μάρτυρα χρησιμοποιούμε κατάλληλες ποσότητες εκχυλίσματος δείγματος που προηγουμένως ήταν αρνητικό στις δοκιμές, αναμεμειγμένες με 10^3 έως 10^4 κύτταρα ανά ml του R. solanacearum βιοποικιλία 2 (π.χ. στέλεχος NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, βλέπε προσάρτημα 2 Α και Β). Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων σε κάθε πλάκα χρησιμοποιούμε τυποποιημένο αιώρημα 10^5 έως 10^6 κυττάρων ανά ml σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS) του R. solanacearum. Εξασφαλίζουμε ότι οι θετικοί μάρτυρες είναι καλά διαχωρισμένοι στη μικρότιτλη πλάκα από το(-α) υπό εξέταση δείγμα(-τα).

Στο προσάρτημα 3 Α παρατίθενται τυποποιημένα υλικά θετικών και αρνητικών μαρτύρων που διατίθενται προς χρήση με αυτή τη δοκιμή.

Το υλικό των μαρτύρων δοκιμάζεται με τρόπο ταυτόσημο με εκείνο του ή των δειγμάτων.

Έχουν επικυρωθεί δύο πρωτόκολλα ELISA.

α) Έμμεση ELISA (Robinson Smith et al., 1995)

1) Χρησιμοποιούμε ποσότητες 100-200 μl εκχυλίσματος δείγματος. (Η θέρμανση στους 100 °C για 4 λεπτά σε υδατόλουτρο ή θερμικό μπλοκ μπορεί να μειώσει σε ορισμένες περιπτώσεις τα μη εξειδικευμένα αποτελέσματα.)

2) Προστίθεται ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος επικάλυψης διπλής ιοντικής ισχύος (προσάρτημα 4) και ανακατεύουμε σε συσκευή vortex.

3) Εφαρμόζονται ποσότητες 100μl σε κάθε ένα από δύο τουλάχιστον φατνία της πλάκας μικροτιτλοδότησης (π.χ. Nunc-Polysorp ή ισοδύναμη) και επωάζονται για 1 ώρα στους 37 °C ή όλη τη νύκτα στους 4 °C.

4) Τα εκχυλίσματα τινάζονται ελαφρά για να απομακρυνθούν από τα φατνία. Τα φατνία πλένονται τρεις φορές με PBS-Tween (προσάρτημα 4), αφήνοντας το τελευταίο διάλυμα πλυσίματος στα φατνία για 5 λεπτά τουλάχιστον.

5) Παρασκευάζεται η κατάλληλη αραίωση αντισωμάτων κατά του R. solanacearum σε ρυθμιστικό διάλυμα φραγμού (προσάρτημα 4). Για επικυρωμένα αντισώματα του εμπορίου, χρησιμοποιούμε τις συνιστώμενες αραιώσεις (συνήθως διπλά συγκεντρωμένες σε σχέση με τον τίτλο).

6) Προσθέτουμε 100 μl σε κάθε φατνίο και επωάζουμε για 1 ώρα στους 37 °C.

7) Τινάζουμε ελαφρά το διάλυμα αντισωμάτων από τα φατνία και πλένουμε όπως προηγουμένως (σημείο 4).

8) Παρασκευάζεται η κατάλληλη αραίωση του δευτερεύοντος συμπλόκου αντισώματος - αλκαλικής φωσφατάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φραγμού (αντισωμάτων). Προσθέτουμε 100 μl σε κάθε φατνίο και επωάζουμε για 1 ώρα στους 37 °C.

9) Τινάζουμε ελαφρά το σύμπλοκο αντισώματος από τα φατνία και πλένουμε όπως προηγουμένως (σημείο 4).

10) Προσθέτουμε 100 μl διαλύματος υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης (προσάρτημα 4) σε κάθε φατνίο. Επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία εργαστηρίου και διαβάζεται η απορρόφηση στα 405 nm σε τακτικά διαλείμματα εντός 90 λεπτών.

β) DASI ELISA

1) Παρασκευάζουμε την κατάλληλη αραίωση πολυκλωνικών ανοσοσφαιρινών κατά του R. solanacearum σε ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης pH 9.6 (προσάρτημα 4). Προσθέτουμε 200 μl σε κάθε φατνίο. Επωάζουμε στους 37 °C για 4-5 ώρες ή στους 4 °C για 16 ώρες.

2) Πλένουμε τα φατνία τρεις φορές με PBS-Tween (προσάρτημα 4).

Προσθέτουμε 190 μl εκχυλίσματος δείγματος σε τουλάχιστον 2 φατνία. Προσθέτουμε επίσης θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες σε δύο φατνία ανά πλάκα. Επωάζουμε για 16 ώρες στους 4 °C.

3) Πλένουμε τα φατνία τρεις φορές με PBS-Tween (προσάρτημα 4).

4) Παρασκευάζουμε κατάλληλη αραίωση μονοκλωνικών αντισωμάτων ειδικά για το R. solanacearum σε PBS (προσάρτημα 4) που περιλαμβάνει επίσης 0,5% αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) και προσθέτουμε 190 μl σε κάθε φατνίο. Επωάζουμε για 2 ώρες στους 37 °C.

5) Πλένουμε τα φατνία τρεις φορές με PBS-Tween (προσάρτημα 4).

6) Παρασκευάζουμε κατάλληλη αραίωση συμπλόκου ανοσοσφαιρινών που έχουν παραχθεί κατά του ποντικιού με αλκαλική φωσφατάση σε PBS. Προσθέτουμε 190 μl σε κάθε φατνίο. Επωάζουμε για 2 ώρες στους 37 °C.

7) Πλένουμε τα φατνία τρεις φορές με PBS-Tween (προσάρτημα 4).

8) Παρασκευάζουμε διάλυμα υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης που περιέχει 1 mg p-nitrophenyl phosphate ανά ml ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (προσάρτημα 4). Προσθέτουμε 200 μl σε κάθε φατνίο. Επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία εργαστηρίου και διαβάζεται η απορρόφηση στα 405 nm σε τακτικά διαλείμματα εντός 90 λεπτών.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής ELISA:

Η δοκιμή ELISA είναι αρνητική εάν η ανάγνωση της μέσης οπτικής πυκνότητας (OD) των φατνίων διπλών δειγμάτων είναι < 2x OD του φατνίου αρνητικού μάρτυρα εκχυλίσματος δείγματος, υπό την προϋπόθεση ότι η OD για τους θετικούς μάρτυρες υπερβαίνει σε όλες τις περιπτώσεις την τιμή του 1,0 (μετά από επώαση 90 λεπτών με το υπόστρωμα) και ότι είναι μεγαλύτερη από την διπλάσια OD των εκχυλισμάτων αρνητικών δειγμάτων.

Η δοκιμή ELISA είναι θετική εάν η ανάγνωση της μέσης οπτικής πυκνότητας (OD) από φατνία διπλών δειγμάτων είναι > 2x OD του φατνίου εκχυλίσματος αρνητικού δείγματος υπό την προϋπόθεση ότι οι τιμές OD σε όλα τα φατνία αρνητικών μαρτύρων είναι < 2x σε σχέση με αυτές των φατνίων θετικών μαρτύρων.

Οι αρνητικές αναγνώσεις ELISA σε φατνία θετικών μαρτύρων δείχνουν ότι η δοκιμή δεν έχει πραγματοποιηθεί με ορθό τρόπο ή ότι παρεμποδίστηκε. Οι θετικές αναγνώσεις ELISA σε φατνία αρνητικών μαρτύρων δείχνουν ότι υπήρξε επιμόλυνση ή δέσμευση μη εξειδικευμένων αντισωμάτων.

9. Βιοδοκιμή

Σημείωση: Οι προκαταρκτικές δοκιμές με τη μέθοδο αυτή θα πρέπει να καθιστούν δυνατή την αναπαραγώγιμη ανίχνευση 10^3 έως 10^4 μονάδων του R. solanacearum που σχηματίζουν αποικίες ανά ml που προστίθεται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που προηγούμενως ήταν αρνητικά στις δοκιμές (για την παρασκευή βλέπε προσάρτημα 3).

Η ύψιστη ευαισθησία της ανίχνευσης μπορεί να αναμένεται όταν χρησιμοποιείται εκχύλισμα δείγματος που έχει μόλις παρασκευασθεί και υπάρχουν οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Ωστόσο, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί επιτυχώς σε εκχυλίσματα που έχουν αποθηκευθεί σε γλυκερίνη στους -68 έως -86 °C.

Το ακόλουθο πρωτόκολλο βασίζεται στον Janse (1988):

9.1. Χρησιμοποιούνται 10 προς δοκιμή φυτά μιάς ευπαθούς ποικιλίας τομάτας (π.χ. Moneymaker ή ποικιλία με ισοδύναμη ευπάθεια όπως έχει προσδιορισθεί από το εργαστήριο δοκιμής) στο στάδιο του 3ου πραγματικού φύλλου για κάθε δείγμα. Για τις λεπτομέρειες καλλιέργειας, βλέπε προσάρτημα 8. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται φυτά μελιτζάνας (π.χ. ποικιλίας Black Beauty ή ποικιλίες με ισοδύναμη ευπάθεια), χρησιμοποιούνται μόνον φυτά στο στάδιο των 2-3 φύλλων έως την πλήρη έκπτυξη του τρίτου πραγματικού φύλλου. Έχει δειχθεί ότι στα φυτά μελιτζάνας τα συμπτώματα είναι λιγότερο έντονα και αναπτύσσονται με πιο αργό ρυθμό. Στις περιπτώσεις που αυτό είναι δυνατόν, συνιστάται επομένως η χρήση σπορόφυτων τομάτας.

9.2. 100 μl του εκχυλίσματος δείγματος κατανέμονται μεταξύ των πειραματοφύτων.

9.2.1. Μόλυνση με σύριγγα

Τα στελέχη των φυτών μολύνονται ακριβώς πάνω από τις κοτυληδόνες με μια σύριγγα με υποδερμική βελόνα (τουλάχιστον 23G). Το δείγμα κατανέμεται μεταξύ των πειραματοφύτων.

9.2.2. Μόλυνση σχισμής

Το φυτό συγκρατείται μεταξύ δύο δακτύλων και μια σταγόνα (περίπου 5-10 μl) του αιωρήματος του ιζήματος τοποθετείται με σιφώνιο επί του στελέχους, μεταξύ των κοτυληδόνων και του πρώτου φύλλου.

Με ένα αποστειρωμένο νυστέρι, πραγματοποιείται στο στέλεχος μια διαγώνια τομή, μήκους 1,0 cm και βάθους ίσου προς τα 2/3 περίπου της διαμέτρου του στελέχους, αρχίζοντας την τομή από τη σταγόνα του ιζήματος.

Η τομή καλύπτεται με αποστειρωμένη βαζελίνη από μια σύριγγα.

9.3. Πέντε (5) σπορόφυτα μολύνονται με την ίδια τεχνική με υδατικό αιώρημα 10^5 έως 10^6 κυττάρων ανά ml που έχει παρασκευασθεί από 48ωρη καλλιέργεια παθογόνου στελέχους του R. solanacearum βιοποικιλίας 2 ως θετικοί μάρτυρες και με ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος (προσάρτημα 4) ως αρνητικοί μάρτυρες. Τα φυτά θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, διαχωρίζονται από τα άλλα φυτά προς αποφυγή επιμολύνσεων.

9.4. Τα πειραματόφυτα αναπτύσσονται σε εγκαταστάσεις καραντίνας για χρονικό διάστημα έως 4 εβδομάδες στους 25-30°C και υψηλή σχετική υγρασία και κατάλληλο πότισμα για την αποφυγή υπεράρδευσης ή μάρανσης λόγω έλλειψης νερού. Για την αποφυγή της μόλυνσης, επωάζουμε τα φυτά θετικούς μάρτυρες και αρνητικούς μάρτυρες σε σαφώς διαχωρισμένους πάγκους σε θερμοκήπιο ή θάλαμο ανάπτυξης ή, στην περίπτωση που ο χώρος είναι περιορισμένος, εξασφαλίζουμε τον αυστηρό

διαχωρισμό μεταξύ των χειρισμών. Εάν πρέπει να επωασθούν φυτά για διαφορετικά δείγματα το ένα κοντά στο άλλο, διαχωρίζονται με τα κατάλληλα παραπετάσματα. Κατά τη λίπανση, το πότισμα, την επιθεώρηση και οιουσδήποτε άλλους χειρισμούς δίδεται εξαιρετική προσοχή ώστε να αποφεύγεται τυχόν επιμόλυνση. Είναι σημαντικό να διατηρούνται τα θερμοκήπια και οι θάλαμοι ανάπτυξης απαλλαγμένα από όλα τα έντομα εχθρούς καθώς μπορεί αυτά να μεταδίδουν το βακτήριο από δείγμα σε δείγμα.

Παρατηρούμε για συμπτώματα μαρασμού, επιναστίας, χλώρωσης ή/και νανισμού.

9.5. Απομονώνουμε από προσβεβλημένα φυτά (ενότητα II.3.) και ταυτοποιούμε καθαρές καλλιέργειες πιθανού R. solanacearum (ενότητα VI.B.).

9.6. Εάν δεν παρατηρηθούν συμπτώματα μετά από 3 εβδομάδες, πραγματοποιείται δοκιμή IF/PCR/απομόνωση σε σύνθετο δείγμα τμημάτων στελεχών μήκους 1 cm από κάθε φυτό δοκιμής που έχουν ληφθεί πάνω από το σημείο μόλυνσης. Εάν η δοκιμή είναι θετική, πραγματοποιούμε εξάπλωση αραιώσεων σε στερεό υπόστρωμα (ενότητα 4.1).

9.7. Ταυτοποιούμε τυχόν καθαρές καλλιέργειες πιθανού R. solanacearum (ενότητα VI.B.).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της βιοδοκιμής

Τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής είναι έγκυρα όταν τα φυτά του θετικού μάρτυρα εμφανίζουν τυπικά συμπτώματα, τα βακτήρια είναι δυνατόν να απομονωθούν εκ νέου από τα εν λόγω φυτά και δεν εντοπίζονται συμπτώματα στους αρνητικούς μάρτυρες.

Η βιοδοκιμή είναι αρνητική αν τα φυτά δοκιμής δεν είναι προσβεβλημένα από R. solanacearum υπό τον όρο ότι το R. solanacearum ανιχνεύεται στους θετικούς μάρτυρες.

Η βιοδοκιμή είνα θετική αν τα φυτά δοκιμής είναι προσβεβλημένα από R. solanacearum.

Β. Δοκιμές ταυτοποίησης

Ταυτοποιούνται οι καθαρές καλλιέργειες των πιθανών απομονώσεων του R. solanacearum χρησιμοποιώντας τουλάχιστον δύο από τις ακόλουθες δοκιμές που βασίζονται σε διαφορετικές βιολογικές αρχές.

Για κάθε δοκιμή που πραγματοποιείται (βλέπε προσάρτημα 3), συμπεριλαμβάνονται γνωστά στελέχη αναφοράς όπου ενδείκνυται.

1. Θρεπτικές και ενζυματικές δοκιμές ταυτοποίησης

Προσδιορίζονται οι ακόλουθες φαινοτυπικές ιδιότητες που παρουσιάζει ή όχι εν γένει το R. solanacearum, σύμφωνα με τις μεθόδους των Lelliott και Stead (1987), Klement et al. (1990), Schaad (2001)

Δοκιμή	Αναμενόμενο αποτέλεσμα
Παραγωγή φθορίζουσας χρωστικής	-
Έγκλειστα πολυ -β- υδροξυβουτυρικού	+
Δοκιμή οξείδωσης/ζύμωσης (O/F)	O+/F-
Δραστηριότητα καταλάσης	+
Δοκιμή οξειδάσης Kovac	+
Αναγωγή νιτρικών ιόντων	+
Χρησιμοποίηση κιτρικών ιόντων	+
Ανάπτυξη στους 40 °C	-
Ανάπτυξη σε 1% NaCl	+
Ανάπτυξη σε 2% NaCl	-
Δραστηριότητα διυδρολάσης της αργινίνης	-
Υγροποίηση ζελατίνης	-
Υδρόλυση αμύλου	-
Υδρόλυση αισκουλίνης	-
Παραγωγή levan	-

2. Δοκιμή IF

2.1. Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml σε ρυθμιστικό διάλυμα IF (προσάρτημα 4).

2.2. Παρασκευάζεται σειρά διπλών αραιώσεων κατάλληλου αντιορρού (βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

2.3. Εφαρμόζουμε τη διαδικασία IF (ενότητα VI.A.5.).

2.4. Επιτυγχάνεται θετική δοκιμή IF εάν ο τίτλος IF της καλλιέργειας είναι ισοδύναμος με αυτόν του θετικού μάρτυρα.

3. Δοκιμή ELISA

Σημείωση: Εάν πραγματοποιούμε μόνον 2 δοκιμές ταυτοποίησης, δεν χρησιμοποιούμε άλλη ορρολογική δοκιμή επιπροσθέτως προς τη μέθοδο αυτή.

3.1. Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 10^8 κυττάρων ανά ml σε 1X PBS (προσάρτημα 4).

3.2. Πραγματοποιούμε την κατάλληλη διαδικασία ELISA με εξειδικευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα του R. solanacearum.

3.3. Η δοκιμή ELISA είναι θετική εάν η ανάγνωση ELISA που προκύπτει από την καλλιέργεια είναι τουλάχιστον η μισή από αυτήν που προκύπτει από το θετικό μάρτυρα.

4. Δοκιμές PCR

4.1. Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml σε αποστειρωμένο νερό μοριακού βαθμού καθαρότητας.

4.2. Θερμαίνονται 100 μl του αιωρήματος κυττάρων σε κλειστούς σωλήνες σε θερμικό μπλοκ ή αναβράζον υδατόλουτρο στους 100 °C για 4 λεπτά. Τα δείγματα μπορούν τότε να αποθηκευθούν σε θερμοκρασία -16 έως -24 °C έως ότου χρειασθεί να χρησιμοποιηθούν.

4.3. Εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες PCR για την ενίσχυση των αμπλικονίων που είναι ειδικά για το R. solanacearum [π.χ. Seal et al. (1993)· Pastrik και Maiss, (2000)· Pastrik et al. (2002)· Boudazin et al. (1999)· Opina et al. (1997), Weller et al. (1999)].

4.4. Επιτυγχάνεται θετική ταυτοποίηση του R. solanacearum εάν τα αμπλικόνια της PCR έχουν το ίδιο μέγεθος και τους ίδιους πολυμορφισμούς μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού όπως το στέλεχος των θετικών μαρτύρων.

5. Δοκιμή FISH

5.1. Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml σε UPW.

5.2. Εφαρμόζεται η διαδικασία FISH (ενότητα VI.A.7.) με τουλάχιστον 2 ολιγοανιχνευτές ειδικούς για το R. solanacearum (προσάρτημα 7).

5.3. Επιτυγχάνεται θετική δοκιμή FISH εάν επιτυγχάνονται οι ίδιες αντιδράσεις από την καλλιέργεια και το θετικό μάρτυρα.

6. Προφίλ σε λιπαρά οξέα (FAP)

6.1. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε trypticase soy agar (Oxoid) για 48 ώρες στους 28 °C.

6.2. Εφαρμόζεται κατάλληλη διαδικασία FAP (Janse, 1991· Stead, 1992).

6.3. Επιτυγχάνεται θετική δοκιμή FAP εάν το προφίλ της πιθανής καλλιέργειας είναι το ίδιο με αυτό του θετικού μάρτυρα. Η παρουσία χαρακτηριστικών λιπαρών

οξέων είναι 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH και 18:1 2OH και η απουσία του 16:0 3OH είναι σε μεγάλο βαθμό ενδεικτική ενός είδους του γένους Ralstonia.

7. Μέθοδοι χαρακτηρισμού στελέχους

Ο χαρακτηρισμός στελέχους χρησιμοποιώντας μία από τις ακόλουθες μεθόδους συνιστάται για κάθε νέα περίπτωση απομόνωσης του R. solanacearum.

Στις περιπτώσεις που κάτι τέτοιο ενδείκνυται, συμπεριλαμβάνονται γνωστά στελέχη αναφοράς για κάθε δοκιμή που πραγματοποιείται (βλέπε προσάρτημα 3).

7.1. Χαρακτηρισμός βιοποικιλίας

Το R. solanacearum χωρίζεται σε βιοποικιλίες με βάση την ικανότητά τους να χρησιμοποιούν ή/και να οξειδώνουν τρεις δισακχαρίτες και τρεις εξοζοαλκοόλες (Hayward, 1964 και Hayward et al., 1990). Το υπόστρωμα ανάπτυξης για τη δοκιμή βιοποικιλίας περιγράφεται στο προσάρτημα 2. Η δοκιμή μπορεί να διεξαχθεί με επιτυχία με μόλυνση με βελόνα του υποστρώματος με καθαρές καλλιέργειες απομονώσεων του R. solanacearum και επώαση στους 28΄1C. Εάν τα υποστρώματα κατανέμονται σε αποστειρωμένες πλάκες καλλιέργειας κυττάρων των 96 φατνίων (200 μl ανά φατνίο), είναι δυνατόν να παρατηρηθεί εντός 72 ωρών αλλαγή χρώματος από το πράσινο της ελιάς στο κίτρινο, πράγμα που αποτελεί ένδειξη θετικού αποτελέσματος της δοκιμής.

	Βιοποικιλία				
	1	2	3	4	5
Χρήση:					
Μαλτόζης	-	+	+	-	+
Λακτόζης	-	+	+	-	+
D (+) Κελλοβιόζης	-	+	+	-	+
Μαννιτόλης	-	-	+	+	+
Σορβιτόλης	-	-	+	+	-
Δουλκιτόλης	-	-	+	+	-

Επιπρόσθετες δοκιμές διαφοροποιούν τη βιοποικιλία 2 σε υπο-φαινότυπους.

	Βιοποικιλία 2A (Παγκόσμια εξάπλωση)	Βιοποικιλία 2A (Στη Χιλή και την Κολομβία)	Βιοποικιλία 2T (Σε τροπικές περιοχές)
Χρησιμοποίηση τρεαλόζης	-	+	+
Χρησιμοποίηση μεσοϊνοσιτόλης	+	-	+
Χρησιμοποίηση D ριβόζης	-	-	+
Πηκτινολυτική δραστηριότητα(¹)	χαμηλή	χαμηλή	υψηλή

(¹) Βλέπε Lelliott and Stead (1987).

7.2. Το γενωμικό αποτύπωμα

Η μοριακή διαφοροποίηση των στελεχών στο σύμπλοκο R. solanacearum μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

7.2.1. Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (RFLP) (Cook et al., 1989).

7.2.2. Επαναληπτική αλληλουχία PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές REP, BOX και ERIC (Louws et al., 1995· Smith et al., 1995).

7.2.3. Ανάλυση πολυμορφισμού ενισχυμένου μήκους θραυσμάτων (AFLP) (Van der Wolf et al., 1998).

7.3. Μέθοδοι PCR

Ειδικοί εκκινητές PCR (Pastrik et al, 2002· βλέπε προσάρτημα 6) είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για τη διαφοροποίηση στελεχών που ανήκουν στην ομάδα 1 (βιοποικιλίες 3, 4 και 5) και στην ομάδα 2 (βιοποικιλίες 1, 2A και 2T) του R. solanacearum, όπως προσδιορίσθηκαν αρχικά από την ανάλυση RFLP (Cook et al., 1989) και την εύρεση της αλληλουχίας των 16S rDNA (Taghavi et al., 1996).

Γ. ΔΟΚΙΜΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ

Η δοκιμή παθογένειας πρέπει να πραγματοποιείται ως τελική επιβεβαίωση της διάγνωσης του R. solanacearum καθώς και για την εκτίμηση της παθογένειας των καλλιεργειών που ταυτοποιούνται ως R. solanacearum.

1) Παρασκευάζεται μόλυσμα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml από καλλιέργεια 24-48 ωρών της απομόνωσης προς εξέταση και κατάλληλο στέλεχος θετικού μάρτυρα του R. solanacearum (π.χ. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857· βλέπε προσάρτημα 3).

2) Μολύνουμε 5-10 ευπαθή σπορόφυτα τομάτας ή μελιτζάνας στο στάδιο του τρίτου πραγματικού φύλλου (βλέπε ενότητα VI.A.9).

3) Επωάζουμε για μέγιστο χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων στους 25-28 ^{0}C και σε υψηλή σχετική υγρασία με κατάλληλο πότισμα έτσι ώστε να αποφευχθεί η υπεράρδευση ή η καταπόνηση από ξηρασία. Με καθαρές καλλιέργειες, η τυπική μάρανση θα πρέπει να εμφανιστεί εντός 14 ημερών. Εάν δεν εμφανιστούν συμπτώματα μετά το εν λόγω χρονικό διάστημα, η καλλιέργεια δεν μπορεί να επαληθευθεί ως παθογόνος μορφή του R. solanacearum.

4) Παρατηρούμε για συμπτώματα μαρασμού ή/και επιναστία, χλώρωση ή νανισμό.

5) Πραγματοποιείται απομόνωση από φυτά που παρουσιάζουν συμπτώματα με αφαίρεση τμήματος του στελέχους 2 cm πάνω από το σημείο μόλυνσης. Τεμαχίζουμε τους ιστούς και παρασκευάζουμε αιώρημα σε ένα μικρό όγκο αποστειρωμένου, αποσταγμένου νερού ή σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (προσάρτημα 4). Απομονώνουμε από το αιώρημα με εξάπλωση αραιώσεων ή γραμμική εξάπλωση σε κατάλληλο υπόστρωμα, κατά προτίμηση σε εκλεκτικό υπόστρωμα (προσάρτημα 2), επωάζουμε για 48-72 ώρες στους 28 ^{0}C και παρατηρούμε το σχηματισμό τυπικών αποικιών του R. solanacearum.

Προσάρτημα 1

Εμπλεκόμενα εργαστήρια στη βελτιστοποίηση και επικύρωση των πρωτοκόλλων

Εργαστήριο(¹)	Θέση	Χώρα
Agentur fór Gesundheit und Ernahrungssicherheit	Βιέννη και Linz	Αυστρία
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Βέλγιο
Plantedirektoratet	Lyngby	Δανία
Central Science Laboratory	York	Αγγλία
Scottish Agricultural Science Agency	Εδιμβούργο	Σκωτία
Laboratoire National de la Protection des Vιgιtaux, Unitι Bactιriologie	Angers	Γαλλία
Laboratoire National de la Protection des Vιgιtaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Γαλλία
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Γερμανία
Pflanzenschutzamt Hannover	Αννόβερο	Γερμανία
State Laboratory	Δουβλίνο	Ιρλανδία

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Ιταλία
Regione Veneto Unitΰ Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Ιταλία
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Κάτω Χώρες
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Κάτω Χώρες
Direcηγo-Geral de Protecηγo das Culturas	Λισσαβώνα	Πορτογαλία
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Ισπανία
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Ισπανία
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Σουηδία
(1) Στοιχεία επιστημόνων: βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main		

Προσάρτημα 2

Θρεπτικά υλικά για την απομόνωση και καλλιέργεια του R. solanacearum

α) Γενικά θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας

Nutrient Agar (NA)

Nutrient agar (Difco)	23,0 g
Αποσταγμένονερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Yeast-Peptone-Glucose-Agar (YPGA)

Yeast Extract (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
D(+)-γλυκόζη (μονοϋδρική)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Sucrose Peptone Agar (SPA)

Sucrose (σακχαρόζη)	20,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Αποσταγμένονερό	1,0 L

pH 7.2 - 7.4

Διαλύονται τα συστατικά και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Θρεπτικό υλικό Kelman's tetrazolium

Casamino Acids (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	10,0 g
Dextrose (δεξτρόζη)	5,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη στους 50 °C και προστίθεται διάλυμα χλωριούχου 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (Sigma), το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση από φίλτρο, ώστε να ληφθεί τελική συγκέντρωση 50 mg ανά λίτρο.

β) Επικυρωμένα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα καλλιέργειας

Θρεπτικό υλικό SMSA (Englebrecht 1994, όπως τροποποιήθηκε από Elphinstone et al., 1996)

Βασικό θρεπτικό υλικό

Casamino acids (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	10,0 g
Γλυκερίνη	5,0 ml
Bacto-Agar (Difco)·(βλέπε) σημείωση 2)	15,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Ακολουθεί ψύξη στους 50 °C και προσθέτουμε υδατικά πυκνά διαλύματα που έχουν αποστειρωθεί με διήθηση από φίλτρο των ακολούθων συστατικών για την επίτευξη των εξειδικευμένων τελικών συγκεντρώσεων:

Crystal Violet (Sigma)	5 mg ανά L
Polymixin-B-Sulphate (Sigma P-1004)	600.000 U (περίπου 100mg) ανά L
Bacitracin (Sigma B-0125)	1250 U (περίπου 25 mg) ανά L
Chloramphenicol (Sigma C-3175)	5 mg ανά L
Penicillin-G (Sigma P-3032)	825 U (περίπου 0,5 mg) ανά L ανά L
χλωριούχο 2,3,5-τριφαινυλο-τετραζόλιο (Sigma)	50 mg ανά L

Σημείωση:

1. Η χρήση άλλων αντιδραστηρίων από αυτά που αναφέρονται παραπάνω ενδέχεται να επηρεάσει την ανάπτυξη του R. solanacearum.

2. Το Oxoid Agar #1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί για το Bacto-Agar (Difco). Στην περίπτωση αυτή, η ανάπτυξη του R. solanacearum θα είναι βραδύτερη, αν και ενδέχεται να μειωθεί επίσης η ανάπτυξη ανταγωνιστικών σαπροφύτων. Για το σχηματισμό των τυπικών αποικιών του R. solanacearum ενδέχεται να χρειαστούν 1-2 ημέρες παραπάνω και ο κόκκινος χρωματισμός ενδέχεται να είναι πιο απαλός και πιο διάχυτος απ' ό,τι στο Bacto-Agar.

3. Η αύξηση της συγκέντρωσης βακιτρακίνης σε 2500 U ανά L ενδέχεται να μειώσει τους πληθυσμούς των ανταγωνιστικών βακτηρίων χωρίς να επηρεάσει την ανάπτυξη του Ralstonia solanacearum.

Αποθηκεύουμε τα θρεπτικά υποστρώματα και τα πυκνά διαλύματα αντιβιοτικών στους 4 °C στο σκοτάδι και τα χρησιμοποιούμε εντός ενός μήνα.

Τα τρυβλία πρέπει να είναι απαλλαγμένα από συμπύκνωση στην επιφάνεια πριν από τη χρήση.

Αποφεύγουμε το υπερβολικό στέγνωμα των τρυβλίων.

Πρέπει να πραγματοποιείται έλεγχος ποιότητας μετά την παρασκευή κάθε νέας παρτίδας υποστρώματος με την εξάπλωση σε τρυβλία του αιωρήματος της καλλιέργειας αναφοράς του R. solanacearum (βλέπε προσάρτημα 3) και την εξέταση ενδεχόμενου σχηματισμού τυπικών αποικιών μετά την επώαση στους 28 °C για 2-5 ημέρες.

γ) Επικυρωμένα υποστρώματα εμπλουτισμού

SMSA Broth (Elphinstone et al., 1996)

Παρασκευάζουμε όπως για το εκλεκτικό υλικό με άγαρ SMSA αλλά παραλείπουμε το Bacto-Agar και το χλωριούχο 2,3,5-τριφαινυλο-τετραζόλιο.

Modified Wilbrink broth (Caruso et al., 2002)

Sucrose (σακχαρόζη)	10g
Proteose peptone	5g
K_2HPO_4	0,5g
$MgSO_4$	0,25g
$NaNO_3$	0,25g
Αποσταγμένο νερό	1 L

Αποστειρώνουμε σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά και ψύχουμε στους 50 °C.

Προσθέτουμε αντιβιωτικά πυκνά διαλύματα όπως και για το ζωμό SMSA.

Προσάρτημα 3

Α. Τυποποιημένο υλικό μαρτύρων που διατίθεται στο εμπόριο

α) Απομονώσεις βακτηρίων

Συνιστάται η χρήση των ακόλουθων βακτηριακών απομονώσεων ως τυποποιημένου υλικού αναφοράς είτε ως θετικών μαρτύρων (πίνακας 1) είτε κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης των δοκιμών για την αποφυγή διασταυρωτών αντιδράσεων (πίνακας 2). Όλα τα στελέχη διατίθενται στο εμπόριο από τους ακόλουθους φορείς:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Central Science Laboratory, York, HB.

2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Κάτω Χώρες.

3. Collection Franηaise de Bactιries Phytopathogθnes (CFBP), INRA Station Phytobactιriologie, Angers, Γαλλία.

Πίνακας 1: Κατάλογος αναφοράς SMT απομονώσεων του R. solanacearum

Κωδικός NCPPB	SMT #	ΑΛΛΟΙ ΚΩΔΙΚΟΙ	ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	Βιοποικιλία
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Αίγυπτος	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Τουρκία	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Αγγλία	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Κύπρος	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Σουηδία	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Βέλγιο	2
NCPPB 4156(*)	71(*)	PD 2762, CFBP 3857	Κάτω Χώρες	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Γαλλία	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Πορτογαλία	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	Ισπανία	2
NCPPB 4161	76	B3B	Γερμανία	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	ΗΠΑ	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Κόστα Ρίκα	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Κολομβία	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Περού	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Βραζιλία	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Περού	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Αυστραλία	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMIb2861	Σρι Λάνκα	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Φιλιππίνες	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Κίνα	5

(*) Χρησιμοποιούμε ως τυποποιημένο στέλεχος αναφοράς του R. solanacearum βιοποικιλία 2 (φυλή 3).

Σημείωση: Η αυθεντικότητα των ανωτέρω στελεχών μπορεί να είναι εγγυημένη μόνον εάν παρέχονται από αυθεντική συλλογή καλλιεργειών.

Πίνακας 2: Κατάλογος αναφοράς SMT ορολογικά ή γενετικά σχετιζομένων βακτηρίων για χρήση στη βελτιστοποίηση των δοκιμών ανίχνευσης.

Κωδικός NCPPB	SMT #	Άλλος κωδικός	Ταυτοποίηση
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	Bacillus polymyxa(1)
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	Pseudomonas marginalis pv. marginalis(1)
NCPPB 4164	-	CFBP 2227	Burkholderia cepacia(2)
NCPPB 4165	-	CFBP 2459	Ralstonia pickettii(2)
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	Ralstonia pickettii(1)
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	Ralstonia sp.(1)
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	Burkholderia andropogonis(1)
NCPPB 353	54	CFBP 3572	Burkholderia caryophylli(1)
NCPPB 945	55	CFBP 3569	Burkholderia cepacia(1)
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	Burkholderia glumae(1)
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	Burkholderia plantarii(1)
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	Banana Blood Disease Bacterium(1) (2) (3)
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	Enterobacter sp.(1)
NCPPB 4169	62	IPO 1695	Enterobacter sp.(1)
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	Ochrobactrum anthropi(1) (2)
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	Curtobacterium sp.(1) (2)
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	Pseudomonas sp.(1)
NCPPB 4173	-	PD 2318	Aureobacterium sp.(2)
NCPPB 4174	81	IVIA 1844,06	Flavobacterium sp.(1) (2)

(1) Πιθανό διασταυρωτά αντιδρών στέλεχος σε ορολογικές δοκιμές (IF ή/και ELISA) με πολυκλωνικούς αντιορούς.

(2) Στέλεχος από το οποίο το προϊόν PCR μπορεί να ενισχυθεί σε ορισμένα εργαστήρια σε όμοιο μέγεθος με αυτό που αναμένουμε όταν χρησιμοποιούμε τους εξειδικευμένους εκκινητές OLI-1 και Y-2 (βλέπε προσάρτημα 6).

(3) Είναι σύνηθες να κάνει διασταυρωτή αντίδραση στις περισσότερες δοκιμές αλλά είναι γνωστό ότι υπάρχει μόνον στη μπανάνα στην Ινδονησία.

β) Τυποποιημένο υλικό μαρτύρων που διατίθεται στο εμπόριο

Το ακόλουθο τυποποιημένο υλικό ελέγχου διατίθεται από τη συλλογή καλλιεργειών NCPPB.

Λυοφιλιωμένο ίζημα εκχυλίσματος πατάτας από 200 υγιείς κονδύλους πατάτας ως αρνητικός μάρτυρας για όλες τις δοκιμές.

Λυοφιλιωμένο ίζημα εκχυλίσματος πατάτας από 200 υγιείς κονδύλους πατάτας που περιέχει 10^3 έως 10^4 και 10^4 έως 10^6 κύτταρα του R. solanacearum βιοποικιλία 2 (στέλεχος NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) ως θετικούς μάρτυρες για ορολογικές δοκιμές και δοκιμές PCR. Καθώς η βιωσιμότητα των κυττάρων επηρεάζεται κατά τη διάρκεια της λυοφιλίωσης, αυτά δεν είναι κατάλληλα ως τυποποιημένοι μάρτυρες για τις δοκιμές απομόνωσης ή τις βιοδοκιμές.

Αιωρήματα του R. solanacearum βιοποικιλία 2 (στέλεχος NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) προσηλωμένα με φορμόλη σε συγκέντρωση 10^6 κυττάρων ανά ml ως θετικοί μάρτυρες για ορολογικές δοκιμές.

Β. Παρασκευή θετικών και αρνητικών μαρτύρων για τις βασικές δοκιμές διαλογής PCR/IF και FISH

Παράγεται καλλιέργεια 48 ωρών παθογόνου στελέχους του R. solanacearum φυλή3/βιοποικιλία2 (π.χ. στέλεχος NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) σε βασικό υπόστρωμα SMSA και παρασκευάζεται αιώρημα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM έτσι ώστε να επιτευχθεί πυκνότητα κυττάρων περίπου $2x10^8$ cfu ανά ml. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με ελαφρώς θολό αιώρημα ισοδύναμο με οπτική πυκνότητα 0,15 σε 600 nm.

Αφαιρούνται κώνοι από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου 200 κονδύλων που έχουν ληφθεί από την παραγωγή ποικιλίας λευκής επιδερμίδας, η οποία είναι γνωστό ότι είναι απαλλαγμένη από το R. solanacearum.

Οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου υποβάλλονται σε κατεργασία όπως συνήθως και το ίζημα αναδιαλύεται σε 10 ml.

Παρασκευάζονται 10 αποστειρωμένα μικροφιαλίδια των 1,5 ml με 900 μl αναδιαλυμένου ιζήματος.

Μεταφέρονται 100 μl αιωρήματος R. solanacearum στο πρώτο μικροφιαλίδιο. Ανακατεύουμε με στροβιλισμό (vortex).

Προσδιορίζονται τα δεκαδικά επίπεδα μόλυνσης με περαιτέρω αραίωση στα επόμενα πέντε μικροφιαλίδια.

Τα έξι μολυσμένα μικροφιαλίδια θα χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες. Τα τέσσερα μη μολυσμένα μικροφιαλίδια θα χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες. Τα μικροφιαλίδια επισημαίνονται καταλλήλως.

Παρακευάζονται ποσότητες 100 μl σε αποστειρωμένα μικροφιαλίδια 1,5 ml και, κατ' αυτόν τον τρόπο, παράγονται 9 επαναλήψεις κάθε δείγματος μάρτυρα. Αποθηκεύονται στους -16 έως -24°C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

Η παρουσία και ο ποσοτικός προσδιορισμός του R. solanacearum στα δείγματα μαρτύρων πρέπει να επιβεβαιωθούν πρώτα από τη δοκιμή IF.

Για τη δοκιμή PCR πραγματοποιείται εξαγωγή DNA από δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων με κάθε σειρά δειγμάτων δοκιμής.

Για τις δοκιμές IF και FISH πραγματοποιούνται δοκιμές σε δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων με κάθε σειρά δειγμάτων δοκιμής.

Για τις δοκιμές IF, FISH και PCR, το R. solanacearum πρέπει να ανιχνευθεί σε τουλάχιστον 10^6 και 10^4 κύτταρα/ml των θετικών μαρτύρων και σε κανέναν από τους αρνητικούς μάρτυρες.

Προσάρτημα 4
Ρυθμιστικά διαλύματα για τις διαδικασίες δοκιμής

ΓΕΝΙΚΑ: Τα αποστειρωμένα ρυθμιστικά διαλύματα που δεν έχουν ανοιχθεί είναι δυνατόν να παραμείνουν αποθηκευμένα έως ένα έτος.

1. Ρυθμιστικά διαλύματα για τη διαδικασία εξαγωγής

1.1. Ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής (50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.0)

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του βακτηρίου από ιστούς φυτών με ομοιογενοποίηση ή ανάδευση.

Na_2HPO_4 (άνυδρο)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Αποσταγμένο νερό	1,00 L

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Πρόσθετα συστατικά μπορούν να είναι χρήσιμα ως ακολούθως:

	Σκοπός	Ποσότητα (ανά L)
Lubrol flakes	Αντικροκιδωτικό(*)	0,5 g
DC silicone antifoam	Αντιαφριστικός παράγοντας(*)	1,0 ml
Tetrasodium pyrophosphate	Αντιοξειδωτικό	1,0 g
Polyvinylpyrrolidone-40000 (PVP-40)	Δέσμευση παρεμποδιστών της PCR	50 g

(*) Για χρήση στο πλαίσιο της μεθόδου εξαγωγής με ομοιογενοποίηση.

1.2. Ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος (10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.2)

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για επανασχηματισμό αιωρήματος και αραίωση εκχυλισμάτων κώνων από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου κονδύλων πατάτας μετά τη συγκέντρωση σε ίζημα μέσω φυγοκέντρισης.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

2. Ρυθμιστικά διαλύματα για τη δοκιμή IF

2.1. Ρυθμιστικό διάλυμα IF (10 mM φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS), pH 7.2)

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την αραίωση των αντισωμάτων.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCL	8,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

2.2. Ρυθμιστικό διάλυμα IF-Tween

Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την πλύση των αντικειμενοφόρων πλακών.

Προστίθεται 0,1% Tween 20 στο ρυθμιστικό διάλυμα IF.

2.3. Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα γλυκερίνης, pH 7.6

Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται ως ρευστό έγκλεισης στα φατνία των αντικειμενοφόρων πλακών της IF για την ενίσχυση του φθορισμού.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Γλυκερίνη	50 ml
Αποσταγμένο νερό	100 ml

Τα διαλύματα αντιξεθωριαστικού υλικού έγκλεισης διατίθενται στο εμπόριο π.χ. Vectashield® (Vector Laboratories) ή Citifluor® (Leica).

3. Ρυθμιστικά διαλύματα για την έμμεση δοκιμή ELISA

3.1. Ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης, διπλής ισχύος, pH 9.6.

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Αποσταγμένο νερό	1,00 L

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Μπορεί να προστεθεί, ως αντιοξειδωτικό, θειώδες νάτριο (0,2%) εάν πρέπει να αποφευχθεί ο σχηματισμός οξειδωμένων αρωματικών ενώσεων.

3.2. 10X φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS), pH 7.4

NaCl	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	29,0 g
KCl	2,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10% Tween 20	5 ml
Αποσταγμένο νερό	895 ml

3.4. Ρυθμιστικό διάλυμα φραγμού (αντισωμάτων) (πρέπει να έχει παρασκευαστεί πρόσφατα)

10X PBS	10,0 ml
Polyvinylpyrrolidone-44000 (PVP-44)	2,0 g
10% Tween 20	0,5 ml
Σκόνη γάλακτος	0,5 g
Αποσταγμένο νερό	συμπληρώνεται μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

3.5. Διάλυμα υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης, pH 9.8

Diethanolamine (Διαιθανολαμίνη)	97 ml
Αποσταγμένο νερό	800 ml

Αναμειγνύονται και ρυθμίζεται η τιμή σε pH 9.8 με πυκνό HCl.

Συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1 λίτρου.

Προστίθενται 0,2 g $MgCl_2$

Διαλύονται 2 δισκία υποστρώματος φωσφατάσης των 5 mg (Sigma) ανά 15 ml διαλύματος.

4. Ρυθμιστικά διαλύματα για τη δοκιμή DASI ELISA

4.1. Ρυθμιστικό διάλυμα επικάλυψης, pH 9.6.

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Αποσταγμένο νερό	1.000 ml

Διαλύονται τα συστατικά και ελέγχεται το pH 9.6.

4.2. 10X φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS), pH 7.2- 7.4

NaCl	80,0 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	4,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	27,0 g
Αποσταγμένο νερό	1 000 ml

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10% Tween 20	5 ml
Αποσταγμένο νερό	950 ml

4.4. Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος, pH 9.8.

Diethanolamine (Διαιθανολαμίνη)	100 ml
Αποσταγμένο νερό	900 ml

Αναμειγνύονται και ρυθμίζεται η τιμή του pH 9.8 με πυκνό HCl.

Προσάρτημα 5
Προσδιορισμός του επιπέδου μόλυνσης στις δοκιμές IF και FISH

1. Μετράται ο μέσος αριθμός των τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά οπτικό πεδίο (c).

2. Υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά φατνίο αντικειμενοφόρου πλάκας μικροσκοπίου (C).

C = c x S/s

όπου S = εμβαδόν του φατνίου μιας πολυφατνιακής αντικειμενοφόρου

και s = εμβαδόν του οπτικού πεδίου του αντικειμενικού

$s = \pi i^2/4G^2K^2$ όπου i = συντελεστήςπεδίου(κυμαίνεται από 8 έως 24 ανάλογα με τον τύπο του προσοφθαλμίου)

K = συντελεστής σωλήνα (1 ή 1,25)

G = μεγεθυντική ισχύς του αντικειμενικού φακού (100x, 40x κ.τ.λ.)

3. Υπολογίζεται ο αριθμός τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος (N)

N = C x 1000/y x F

όπου y = όγκος του αναδιαλυμένου ιζήματος σε κάθε φατνίο

και F = συντελεστής αραίωσης του αναδιαλυμένου ιζήματος

Προσάρτημα 6

Επικυρωμένα πρωτόκολλα και αντιδραστήρια PCR

Σημείωση: Οι προκαταρκτικές δοκιμές πρέπει να επιτρέπουν την αναπαραγώγιμη ανίχνευση 10^3 έως 10^4 κυττάρων του R. solanacearum ανά ml εκχυλίσματος δείγματος.

Οι προκαταρκτικές δοκιμές πρέπει επίσης να μην δείχνουν οιαδήποτε λανθασμένα θετικά αποτελέσματα με ένα σύνολο επιλεγμένων στελεχών βακτηρίων (βλέπε προσάρτημα 3).

1. Πρωτόκολλο PCR των Seal et al. ,(1993)

1.1. Εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων

Πρόσθιος εκκινητής OLI-1 5΄-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3΄

Αντίστροφος εκκινητής Y-2 5΄-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3΄

Αναμενόμενο μέγεθος αμπλικονίου από το πρότυπο DNA του R. solanacearum = 288 bp

1.2. Μείγμα αντίδρασης PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο UPW	17,65 µl	
10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR([1]) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
μείγμα dNTP (20mM)	0,25 µl	0,2 mM
Εκκινητής OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Εκκινητής Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Taq πολυμεράση (5U/µl) [1]	0,1 µl	0,5 U
Όγκος δείγματος	2,0 µl	
Συνολικός όγκος	25 µl	

([1]) Η μέθοδος έχει επικυρωθεί με τη χρήση τηςTaq πολυμεράσης των Perkin Elmer (AmpliTaq) και Gibco BRL.

1.3. Συνθήκες αντίδρασης PCR

Ακολουθείται το εξής πρόγραμμα:

1 κύκλος από: i) 2 λεπτά στους 96 °C (μετουσίωση του πρότυπου DNA)

35 κύκλοι από:	ii)	20 δευτερόλεπτα στους 94 °C (μετουσίωση του προτύπου DNA)
	iii)	20 δευτερόλεπτα στους 68 °C (προσκόλληση εκκινητών)
	iv)	30 δευτερόλεπτα στους 72 °C (επέκταση αντιγράφου)
1 κύκλος από:	v)	10 λεπτά στους 72 °C (τελική επέκταση)
	vi)	διατήρηση στους 4 °C

Σημείωση: Το πρόγραμμα αυτό βελτιστοποιήθηκε για χρήση με θερμικό κυκλοποιητή Perkin Elmer 9600. Ενδέχεται να απαιτηθεί τροποποίηση της διάρκειας των βημάτων των κύκλων ii), iii) και iv) για χρήση με άλλα μοντέλα.

1.4. Ανάλυση του αμπλικονίου με ένζυμο περιορισμού

Τα προϊόντα PCR που έχουν ενισχυθεί από το DNA του R. solanacearum παράγουν έναν χαρακτηριστικό πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού με το ένζυμο Ava II μετά από επώαση στους 37 °C.

2. Πρωτόκολλο PCR των Pastrik και Maiss, (2000)

2.1. Εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων

Πρόσθιος εκκινητής Ps-1 5΄- AGT CGA ACG GCA GCG GGG G -3΄

Αντίστροφος εκκινητής Ps-2 5΄- GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA -3΄

Αναμενόμενο μέγεθος αμπλικονίου από το πρότυπο DNA του R. solanacearum = 553 bp

2.2. Μείγμα αντίδρασης PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο UPW	16,025 μl	
10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR(1)	2,5 μl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (κλάσμα V) (10%)	0,25 μl	0,1%
μείγμα d-NTP (20mM)	0,125 μl	0,1 mM
Εκκινητής Ps-1 (10 μM)	0,5 μl	0,2 μM
Εκκινητής Ps-2 (10 μM)	0,5 μl	0,2 μM
Taq πολυμεράση (5U/μl)(1)	0,1 μl	0,5 U
Όγκος δείγματος	5,0 μl	
Συνολικός όγκος	25,0 μl	

(1) Οι μέθοδοι έχουν επικυρωθεί με τη χρήση της Taq πολυμεράσης των Perkin Elmer (AmpliTaq) και Gibco BRL.

Σημείωση: Βελτιστοποιήθηκε αρχικά για τον θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC 200 με Gibco Taq πολυμεράση. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν στις ίδιες συγκεντρώσεις η Perkin Elmer AmpliTaq καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα.

2.3. Συνθήκες για την αντίδραση PCR

Ακολουθείται το εξής πρόγραμμα:

1 κύκλος από:	i) 5 λεπτά στους 95 °C (μετουσίωση του πρότυπουDNA)
35 κύκλοι από:	ii) 30 δευτερόλεπτα στους 95 °C (μετουσίωση του πρότυπου DNA)
	iii) 30 δευτερόλεπτα στους 68 °C (προσκόλληση εκκινητών)
	iv) 45 δευτερόλεπτα στους 72 °C (επέκταση αντιγράφου)
1 κύκλος από:	v) 5 λεπτά στους 72 °C (τελική επέκταση)
	vi) διατήρηση στους 4 °C

Σημείωση: Το πρόγραμμα αυτό βελτιστοποιείται για χρήση με θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC 200. Ενδέχεται να απαιτηθεί τροποποίηση της διάρκειας των βημάτων των κύκλων ii), iii) και iv) για χρήση με άλλα μοντέλα.

2.4. Ανάλυση του αμπλικονίου με ένζυμο περιορισμού

Τα προϊόντα PCR που έχουν ενισχυθεί από το DNA του R. solanacearum παράγουν έναν χαρακτηριστικό πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού με το ένζυμο Taq I μετά από επώαση στους 65 °C για 30 λεπτά. Τα θραύσματα εκ περιορισμού που αποκτώνται από το ειδικό για το R. solanacearum θραύσμα έχουν μέγεθος 457 bp και 96 bp.

3. Πρωτόκολλο πολλαπλής PCR με εσωτερικό μάρτυρα PCR (Pastrik et al., 2002)

3.1. Εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων

Πρόσθιος εκκινητής RS-1-F 5΄- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3΄

Αντίστροφος εκκινητής RS-1-R 5΄- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3΄

Πρόσθιος εκκινητής NS-5-F 5΄- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G -3΄

Αντίστροφος εκκινητής NS-6-R 5΄- GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC -3΄

Αναμενόμενο μέγεθος αμπλικονίου από το πρότυπο DNA του R. solanacearum = 718 bp (σετ εκκινητών RS)

Αναμενόμενο μέγεθος αμπλικονίου από εσωτερικό μάρτυρα της PCR 18S rRNA = 310 bp (σετ εκκινητών NS)

3.2. Μείγμα αντίδρασης PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο UPW	12,625 μl	
10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR(1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 μl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (κλάσμα V) (10%)	0,25 μl	0,1%
μείγμα d-NTP (20mM)	0,125 μl	0,1 mM
Εκκινητής RS-1-F (10μM)	2,0 μl	0,8 μM
Εκκινητής RS-1-R (10μM)	2,0 μl	0,8 μM
Εκκινητής NS-5-F (10μM)(2)	0,15 μl	0,06 μM
Εκκινητής NS-6-R (10μM)(2)	0,15 μl	0,06 μM
Taq πολυμεράση (5U/μl)(1)	0,2 μl	1,0 U
Όγκος δείγματος	5,0 μl	
Συνολικός όγκος	25,0 μl	

(1) Οι μέθοδοι έχουν επικυρωθεί με τη χρήση της Taq πολυμεράσης των Perkin Elmer (AmpliTaq) και Gibco BRL.

(2) Η συγκέντρωση των εκκινητών NS-5-F και NS-6-R βελτιστοποιήθηκε για το εκχύλισμα κώνου από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου πατάτας χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ομοιογενοποίησης και τον καθαρισμό DNA σύμφωνα με τον Pastrik (2000) (βλέπε ενότητα VI.A.6.1.α.). Η επαναβελτιστοποίηση των συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων απαιτείται εάν χρησιμοποιηθεί η εξαγωγή με ανάδευση ή άλλη μέθοδο απομόνωσης του DNA.

3.3. Συνθήκες για την αντίδραση PCR

Ακολουθείται το εξής πρόγραμμα:

1 κύκλος από: i) 5 λεπτά στους 95 ^{0}C (μετουσίωση του προτύπου DNA)

35 κύκλοι από: ii) 30 δευτερόλεπτα στους 95 ^{0}C (μετουσίωση του προτύπου DNA)

iii) 30 δευτερόλεπτα στους 58 ^{0}C (προσκόλληση εκκινητών)

iv) 45 δευτερόλεπτα στους 72 ^{0}C (επέκταση αντιγράφου)

1 κύκλος από: v) 5 λεπτά στους 72 ^{0}C (τελική επέκταση)

vi) διατήρηση στους 4 ^{0}C

Σημείωση: Το πρόγραμμα αυτό βελτιστοποιείται για χρήση με θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC 200. Ενδέχεται να απαιτηθεί τροποποίηση της διάρκειας των βημάτων των κύκλων ii), iii) και iv) για χρήση με άλλα μοντέλα.

3.4. Ανάλυση του αμπλικονίου με ένζυμο περιορισμού

Τα προϊόντα PCR που έχουν ενισχυθεί από το DNA του R. solanacearum παράγουν έναν χαρακτηριστικό πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού με το ένζυμο Bsm I ή ένα ισοσχιζομερές (π.χ. Mva 1269 I) μετά από επώαση στους 65 ^{0}C για 30 λεπτά.

4. Πρωτόκολλο PCR εξειδικευμένο για βιοποικιλίες του R. solanacearum (Pastrik et al, 2001)

4.1. Εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων

Πρόσθιος εκκινητής RS-1-F 5΄- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3΄

Αντίστροφος εκκινητής RS-1-R 5΄- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3΄

Αντίστροφος εκκινητής RS-3-R 5΄- TTC ACG GCA AGA TCG CTC -3΄

Αναμενόμενο μέγεθος αμπλικονίου από το πρότυπο DNA του R. solanacearum:

με RS-1-F/RS-1-R = 718 bp

με RS-1-F/RS-3-R = 716 bp

4.2. Μείγμα αντίδρασης PCR

α) PCR ειδική για τη βιοποικιλία 1/2

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο UPW	12,925 μl	
10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR(1)	2,5 μl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (κλάσμα V) (10%)	0,25 μl	0,1%
Μείγμα d-NTP (20mM)	0,125 μl	0,1 mM
Εκκινητής RS-1-F (10 μM)	2 μl	0,8 μM
Εκκινητής RS-1-R (10 μM)	2 μl	0,8 μM
Taq πολυμεράση (5U/μl)(1)	0,2 μl	1 U
Όγκος δείγματος	5,0 μl	
Συνολικός όγκος	25,0 μl	

(1) Οι μέθοδοι έχουν επικυρωθεί με τη χρήση της Taq πολυμεράσης των Perkin Elmer (AmpliTaq) και Gibco BRL.

β) PCR ειδική για τη βιοποικιλία 3/4/5

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο UPW	14,925 μl	
10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR(1)	2,5 μl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (κλάσμα V) (10%)	0,25 μl	0,1%
μείγμα d-NTP (20mM)	0,125 μl	0,1 mM
Εκκινητής RS-1-F (10 μM)	1 μl	0,4 μM
Εκκινητής RS-3-R (10 μM)	1 μl	0,4 μM
Taq πολυμεράση (5U/μl)(1)	0,2 μl	1 U
Όγκος δείγματος	5,0 μl	
Συνολικός όγκος	25,0 μl	

(1) Οι μέθοδοι έχουν επικυρωθεί με τη χρήση της Taq πολυμεράσης των Perkin Elmer (AmpliTaq) και Gibco BRL.

4.3. Συνθήκες για την αντίδραση PCR

Ακολουθείται το εξής πρόγραμμα για τις αντιδράσεις που είναι ειδικές για τη βιοποικιλία 1/2 και τη βιοποικιλία 3/4/5:

1 κύκλος από: i) 5 λεπτά στους 95 ^{0}C (μετουσίωση του προτύπου DNA)

35 κύκλοι από: ii) 30 δευτερόλεπτα στους 95 ^{0}C (μετουσίωση του προτύπου DNA)

iii) 30 δευτερόλεπτα στους 58 ^{0}C (προσκόλληση εκκινητών)

iv) 45 δευτερόλεπτα στους 72 ^{0}C (επέκταση αντιγράφου)

1 κύκλος από: v) 5 λεπτά στους 72 °C (τελική επέκταση)
vi) διατήρηση στους 4 °C

Σημείωση: Το πρόγραμμα αυτό βελτιστοποιήθηκε για χρήση με θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC 200. Ενδέχεται να απαιτηθεί τροποποίηση της διάρκειας των βημάτων των κύκλων ii), iii) και iv) για χρήση με άλλα μοντέλα.

4.4. Ανάλυση του αμπλικονίου με ένζυμο περιορισμού

Τα προϊόντα PCR που έχουν ενισχυθεί από το DNA του R. solanacearum χρησιμοποιώντας εκκινητές RS-1-F και RS-1-R παράγουν ένα χαρακτηριστικό πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού με το ένζυμο Bsm I ή ένα ισοσχιζομερές (π.χ. Mva 1269 I) μετά από επώαση στους 65 °C για 30 λεπτά. Τα προϊόντα PCR που έχουν ενισχυθεί από το DNA του R. solanacearum χρησιμοποιώντας εκκινητές RS-1-F και RS-3-R δεν έχουν εστίες περιορισμού.

5. Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης

5.1. Bromophenol blue (10% πυκνό διάλυμα)

Bromophenol blue	5 g
Αποσταγμένο νερό (διπλά αποσταγμένο)	50 ml

5.2. Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης

Γλυκερίνη (86%)	3,5 ml
Bromophenol blue (5.1)	300 μl
Αποσταγμένο νερό (διπλά αποσταγμένο)	6,2 ml

6. 10X Tris Acetate EDTA (TAE) ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8.0

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris	48,40 g
Κρυσταλλικό οξικό οξύ	11,42 ml
EDTA (disodium salt)	3,72 g
Αποσταγμένο νερό	1,00 L

Διαλύεται σε 1X πριν τη χρήση.

Διατίθεται επίσης στο εμπόριο (π.χ. Invitrogen ή ισοδύναμο).

Προσάρτημα 7

Επικυρωμένα αντιδραστήρια για τη δοκιμή FISH

1. Ολιγοανιχνευτές

ανιχνευτής OLI-1-CY3 ειδικός για το R. solanacearum: 5΄- GGC AGG TAG CAA GCT ACC CCC-3΄

Μη εξειδικευμένος ανιχνευτής ευβακτηρίου EUB-338-FITC: 5΄- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3΄

2. Προσηλωτικό διάλυμα

[ΠΡΟΣΟΧΗ! ΤΟ ΠΡΟΣΗΛΩΤΙΚΟ ΥΓΡΟ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΫΔΗ Η ΟΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ ΤΟΞΙΚΗ. ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΦΟΡΟΥΝΤΑΙ ΓΑΝΤΙΑ ΚΑΙ ΝΑ ΜΗΝ ΓΙΝΟΝΤΑΙ ΕΙΣΠΝΟΕΣ. ΣΥΝΙΣΤΑΤΑΙ Η ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΕ ΑΠΑΓΩΓΟ]

i) Θερμαίνονται 9 ml ύδατος μοριακού βαθμού καθαρότητας [π.χ. υπέρ καθαρό νερό (UPW)] σε περίπου 60 °C και προστίθενται 0,4 g παραφορμαλδεΰδης. Η παραφορμαλδεΰδη διαλύεται μετά την προσθήκη 5 σταγόνων 1N NaOH και ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα.

ii) Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7.0 με την προσθήκη 1ml 0,1M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PB· pH 7.0) και 5 σταγόνων 1N HCl. Ελέγχεται το pH με ταινίες δεικτών και προσαρμόζεται εάν είναι απαραίτητο με HCl ή NaOH. [ΠΡΟΣΟΧΗ! ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΠΕΧΑΜΕΤΡΟ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕ ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΫΔΗ]

iii) Το διάλυμα φιλτράρεται μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,22 μm και διατηρείται απαλλαγμένο από σκόνη στους 4 °C έως ότου ξαναχρησιμοποιηθεί.

3. 3X Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7.4)
EDTA (αποστειρωμένο με διήθηση από φίλτρο και σε αυτόκαυστο)	15 mM

Αραιώνεται σε 1X όπως απαιτείται.

4. Διάλυμα υβριδισμού

1X Hybmix

Sodium dodecyl sulphate (SDS)	0,01%
Formamide (φορμαμίδη)	30%
ανιχνευτής EUB 338	5 ng/μl
ανιχνευτής OLI-1 ή OLI-2	5 ng/μl

Παρασκευάζονται ποσότητες διαλύματος υβριδισμού σύμφωνα με τους υπολογισμούς του πίνακα 1. Για κάθε αντικειμενοφόρο (που περιλαμβάνει 2 διαφορετικά δείγματα εις διπλούν) απαιτούνται 90 μl διαλύματος υβριδισμού. ΠΡΟΣΟΧΗ: Η ΦΟΡΜΑΜΙΔΗ ΕΙΝΑΙ ΠΟΛΥ ΤΟΞΙΚΗ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΟ ΛΟΓΟ ΑΥΤΟ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΑΝΤΙΑ ΚΑΙ ΝΑ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΟΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ!

Πίνακας 1: Συνιστώμενες ποσότητες για την παρασκευή του μείγματος υβριδισμού

Αριθμός αντικειμενοφόρων:	1	4	6	8	10
Αποστειρωμένο UPW	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1% SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamide (φορμαμίδη)	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Ανιχνευτής EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Ανιχνευτής OLI-1 ή OLI-2 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Συνολικός όγκος (μl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Σημείωση: Όλα τα διαλύματα που περιέχουν φωτοευαίσθητους ολιγοανιχνευτές αποθηκεύονται στο σκοτάδι στους -20 °C.

Προστατεύονται από το άμεσο φως του ηλίου ή το ηλεκτρικό φως κατά τη χρήση.

5. 0,1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.0

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Αποσταγμένο νερό	1,00 L

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Προσάρτημα 8

Καλλιέργεια μελιτζάνας και τομάτας

Σπόροι τομάτας (Lycopersicon esculentum) ή μελιτζάνας (Solanum melongena) σπέρνονται σε παστεριωμένο υπόστρωμα. Μετά την πλήρη έκπτυξη των κοτυληδόνων (10-14 ημέρες), τα σπορόφυτα μεταφυτεύονται σε γλάστρες με παστεριωμένο υπόστρωμα.

Τα φυτά μελιτζάνας ή τομάτας πρέπει να καλλιεργούνται σε θερμοκήπιο με τις ακόλουθες περιβαλλοντικές συνθήκες πριν από την τεχνητή μόλυνση:

Μήκος ημέρας:	14 ώρες ή φυσικό μήκος ημέρας, αν είναι μεγαλύτερο
Θερμοκρασία:	ημέρα: 21 έως 24 °C, νύχτα: 14 έως 18 °C.
Ευπαθής ποικιλία τομάτας:	«Moneymaker»
Ευπαθής ποικιλία μελιτζάνας:	«Black Beauty»

Προμηθευτές: βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172: 762-770.

2. Anon. 1998. Οδηγία 98/57/ΕΚ του Συμβουλίου, της 20ής Ιουλίου 1998, για τον έλεγχο του Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων L235, 1-39.

3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of Ralstonia solanacearum and application to the identification of European isolates. European Journal of Plant Pathology 105: 373-380.

4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J. L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of Ralstonia solanacearum in Asymptomatic Potato Tubers. Applied and Environmental Microbiology 68: 3634-3638.

5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of Pseudomonas solanacearum: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Molecular Plant-Microbe Interactions 1: 113-121.

6. Elphinstone, J. G., Hennessy, J., Wilson, J. K. and Stead, D. E. 1996. Sensitivity of detection of Ralstonia solanacearum in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26: 663-678.

7. Englebrecht, M. C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of Pseudomonas solanacearum. In: A. C. Hayward (ed.) Bacterial Wilt Newsletter 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

8. Hayward, A.C., 1964. Characteristics of Pseudomonas solanacearum. Journal of Applied Bacteriology 27: 265-277.

9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of Pseudomonas solanacearum. Journal of Applied Bacteriology 69: 269-280.

10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of Ralstonia solanacearum in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. J. Phytopathology 146: 379-384.

11. Janse, J. D. (1988) A detection method for Pseudomonas solanacearum in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18: 343-351.

12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of Pseudomonas solanacaerum strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14: 335-345.

13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of Pseudomonas solanacearum to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44: 693-695.

14. Klement Z.· Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadımiai Kiadσ, Budapest, 568 pp.

15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.

16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne et al., (eds). Klewer Academic Publishers. pp. 117-121.

17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60: 2286-2295

18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. Phytopathology 85: 528-536.

19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N.Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying Burkholderia solanacearum (formerly Pseudomonas solanacearum). As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5: 19-33.

20. Pastrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of R. solanacearum in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology 148: 619-626.

21. Pastrik, K. H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of Ralstonia solanacearum by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108: 831-842.

22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J. G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to Pseudomonas solanacearum, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agricultural Immunology 7: 67-79.

23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.· St. Paul, Minnesota:, 373 pp

24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W.Young, and M.J.Daniels. 1993. Detection of Pseudomonas solanacearum, Pseudomonas syzygii, Pseudomonas pickettii and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.

25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of Burkholderia solanacearum (synonym Pseudomonas solanacearum) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61: 4262-4268.

26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other Pseudomonas spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42: 281-295.

27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysiss of the phylogenetic relationships of strains of Burkholderia solanacearum, Pseudomonas syzygii, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46: 10-15.

28. Van Der Wolf, J. M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of Ralstonia solanacearum Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.

29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of Ralstonia solanacearum strains using an automated and quantitative flourogenic 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66: 2853-2858.

30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L.Akkermans. 1998. Detection of Ralstonia solanacearum , which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

1. Για κάθε πιθανολογούμενη παρουσία για την οποία υπάρχει θετικό αποτέλεσμα στη (στις) δοκιμή(-ές) διαλογής, σύμφωνα με τις σχετικές μεθόδους που ορί-

ζονται στο παράρτημα ΙΙ για το αναφερόμενο φυτικό υλικό και για άλλες περιπτώσεις, και για την οποία αναμένεται επιβεβαίωση ή διάψευση με την ολοκλήρωση των εν λόγω μεθόδων, παρακρατούνται και φυλάσσονται κατάλληλα:

- όλοι οι κόνδυλοι του δείγματος και, όταν είναι εφικτό, όλα τα φυτά της δειγματοληψίας,
- κάθε εναπομένον εκχύλισμα και πρόσθετο υλικό που παρασκευάσθηκε για την ή τις δοκιμές διαλογής, π.χ. αντικειμενοφόροι πλάκες ανοσοφθορισμού,

και

- όλη η σχετική τεκμηρίωση, μέχρι την ολοκλήρωση των εν λόγω μεθόδων.

Η παρακράτηση των κονδύλων θα καταστήσει δυνατή τη διεξαγωγή δοκιμών ποικιλιών όπου αυτό ενδείκνυται.

2. Σε περίπτωση θετικής επιβεβαίωσης του οργανισμού, παρακρατείται και φυλάσσεται κατάλληλα:

- το υλικό που αναφέρεται στην παράγραφο 1,

και

- δείγμα του μολυσμένου υλικού τομάτας ή μελιτζάνας το οποίο έχει μολυνθεί τεχνητά με εκχύλισμα κονδύλου ή φυτού, όπου αυτό ενδείκνυται,

και

- η απομονωμένη καλλιέργεια του οργανισμού

για τουλάχιστον ένα μήνα μετά τη διαδικασία κοινοποίησης του άρθρου 5 παράγραφος 2 του παρόντος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Τα στοιχεία των ελέγχων που αναφέρονται στο άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο i) του παρόντος περιλαμβάνουν κατά περίπτωση:

(i) τους τόπους παραγωγής,

- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί πατάτες που έχουν κλωνική σχέση με τις μολυσμένες από τον οργανισμό πατάτες,
- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί τομάτες που έχουν την ίδια προέλευση με τις μολυσμένες από τον οργανισμό τομάτες,
- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί πατάτες ή τομάτες οι οποίες υπόκεινται σε επίσημο έλεγχο λόγω της πιθανολογούμενης εμφάνισης του οργανισμού,
- όπου καλλιεργούνται ή έχουν καλλιεργηθεί πατάτες που έχουν κλωνική σχέση με πατάτες που καλλιεργούνται σε μολυσμένους από τον οργανισμό τόπους,
- όπου καλλιεργούνται πατάτες ή τομάτες, οι οποίες γειτνιάζουν με μολυσμένους τόπους παραγωγής, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό και εγκαταστάσεις παραγωγής απευθείας ή μέσω κοινού αναδόχου,
- που χρησιμοποιούν επιφανειακό νερό για άρδευση ή ψεκασμό από πηγές για τις οποίες έχει επιβεβαιωθεί ή πιθανολογείται ότι έχουν μολυνθεί από τον οργανισμό,
- που χρησιμοποιούν επιφανειακό νερό για άρδευση ή ψεκασμό από πηγή που χρησιμοποιείται από κοινού με τόπους παραγωγής για τους οποίους έχει επιβεβαιωθεί ή πιθανολογείται ότι έχουν μολυνθεί από τον οργανισμό,
- που πλημμυρίζουν ή έχουν πλημμυρίσει με επιφανειακό νερό για το οποίο έχει επιβεβαιωθεί ή πιθανολογείται ότι έχει μολυνθεί από τον οργανισμό,

και

(ii) το επιφανειακό νερό το οποίο χρησιμοποιήθηκε για άρδευση ή ψεκασμό ή το οποίο έχει πλημμυρίσει αγρούς ή τόπους παραγωγής οι οποίοι επιβεβαιώθηκαν να είναι μολυσμένοι από τον οργανισμό.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

1. Τα στοιχεία που λαμβάνονται υπόψη στον προσδιορισμό της έκτασης της πιθανής μόλυνσης βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο iii) του παρόντος και του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο γ) σημείο iii) του παρόντος περιλαμβάνουν, κατά περίπτωση:

- το καταχωρισμένο φυτικό υλικό που παράγεται σε τόπο παραγωγής χαρακτηρισμένο ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο ii) του παρόντος,
- τον (ή τους) τόπο(-ους) παραγωγής που έχει κάποιο δεσμό παραγωγής με το καταχωρισμένο φυτικό υλικό που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο ii) του παρόντος, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που μοιράζονται τον εξοπλισμό και εγκαταστάσεις παραγωγής απευθείας ή μέσω κοινού αναδόχου,
- το καταχωρισμένο φυτικό υλικό που παράγεται στον ή τους τόπους παραγωγής που αναφέρονται στην προηγούμενη περίπτωση, ή που υπήρχε στον ή τους τόπους παραγωγής κατά την ίδια περίοδο κατά την οποία το καταχωρισμένο φυτικό υλικό που χαρακτηρίστηκε ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο ii) του παρόντος υπήρχε στους τόπους παραγωγής που αναφέρονται στην πρώτη περίπτωση,
- τις εγκαταστάσεις όπου διακινείται το καταχωρισμένο φυτικό υλικό προέλευσης των ανωτέρω τόπων παραγωγής,
- κάθε μηχάνημα, όχημα, περιέκτης, αποθήκη ή μονάδα αυτών και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας, που ενδέχεται να έχουν έλθει σε επαφή με το καταχωρισμένο φυτικό υλικό χαρακτηρισμένο ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο ii) του παρόντος,
- κάθε καταχωρισμένο φυτικό υλικό που έχει αποθηκευτεί ή ήλθε σε επαφή, με οποιαδήποτε κατασκευή ή αντικείμενα που απαριθμούνται στην προηγούμενη περίπτωση, πριν από τον καθαρισμό και την απολύμανση αυτών των κατασκευών και αντικειμένων,
- βάσει των αποτελεσμάτων των ελέγχων και των δοκιμών που διενεργούνται σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο i) του παρόντος για τις πατάτες, εκείνους τους κονδύλους ή φυτά με αδελφική ή γονική κλωνική σχέση, και, για τις τομάτες, εκείνα τα φυτά της ίδιας προέλευσης, με το καταχωρισμένο φυτικό υλικό που χαρακτηρίστηκε ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο ii) του παρόντος και τα οποία, μολονότι ενδέχεται να έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα κατά τις δοκιμές ανίχνευσης του οργανισμού, φαίνεται ότι είναι πιθανή η μόλυνση μέσω κλωνικής σχέσης. Δοκιμή ποικιλιών μπορεί να αναληφθεί για την επαλήθευση της ταυτότητας των μολυσμένων και κλωνικά σχετιζόμενων κονδύλων ή φυτών,
- τον ή τους τόπους παραγωγής του καταχωρισμένου φυτικού υλικού που αναφέρεται στην προηγούμενη περίπτωση,
- τον ή τους τόπους παραγωγής καταχωρισμένου φυτικού υλικού που χρησιμοποιούν νερό για άρδευση ή ψεκασμό το οποίο έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο γ) σημείο ii) του παρόντος,
- το καταχωρισμένο φυτικό υλικό που έχει παραχθεί σε αγρούς οι οποίοι έχουν πλημμυρίσει με επιφανειακό νερό το οποίο έχει επιβεβαιωθεί ότι έχει μολυνθεί.

2. Τα στοιχεία που λαμβάνονται υπόψη στον προσδιορισμό της πιθανής μετάδοσης που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο iv) του παρόντος και το άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχείο γ) σημείο iii) του παρόντος περιλαμβάνουν:

i) στις περιπτώσεις βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο iv) του παρόντος:

- τη γειτνίαση άλλων τόπων παραγωγής όπου καλλιεργείται το καταχωρισμένο φυτικό υλικό,
- τη συνήθη παραγωγή και χρησιμοποίηση του αποθέματος πατατόσπορου,

- τους τόπους παραγωγής που χρησιμοποιούν επιφανειακό νερό για άρδευση ή ψεκασμό του καταχωρισμένου φυτικού υλικού σε περιπτώσεις κατά τις οποίες υπάρχει ή υπήρξε κίνδυνος απορροών επιφανειακού νερού από καλλιεργήσιμα εδάφη που έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο ii) του παρόντος ή πλημμύρας των εδαφών αυτών από επιφανειακό νερό,

ii) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες το επιφανειακό νερό χαρακτηρίστηκε ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο γ) σημείο ii) του παρόντος:

- τον ή τους τόπους παραγωγής του καταχωρισμένου φυτικού υλικού που γειτνιάζουν ή που υπάρχει κίνδυνος να πλημμυρίσουν με επιφανειακό νερό χαρακτηρισμένο ως μολυσμένο,

- οποιαδήποτε διακριτή λεκάνη άρδευσης που συνδέεται με το επιφανειακό νερό που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο,

- ύδατα που συνδέονται με το επιφανειακό νερό που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο, λαμβάνοντας υπόψη:

- την κατεύθυνση και το ρυθμό ροής του νερού που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο,

- την παρουσία άγριων σολανωδών φυτών ξενιστών.

3. Η κοινοποίηση που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 2 πρώτο εδάφιο του παρόντος παρέχεται ως εξής:

- αμέσως μετά την επιβεβαίωση της παρουσίας του οργανισμού μέσω εργαστηριακών δοκιμών, κάνοντας χρήση των μεθόδων που παρατίθενται στο παράρτημα II, τουλάχιστον:

- όσον αφορά τις πατάτες,

(α) την ονομασία της ποικιλίας της παρτίδας,

(β) τον τύπο [πατάτες εμπορίου (ware), πατατόσπορος, κ.τ.λ.] και, όπου ενδείκνυται, την κατηγορία του πατατόσπορου,

- όσον αφορά τα φυτά τομάτας, την ονομασία της ποικιλίας της παρτίδας και, όπου είναι σκόπιμο, την κατηγορία,

- με την επιφύλαξη των απαιτήσεων κοινοποίησης πιθανολογούμενης εμφάνισης του άρθρου 4 παράγραφος 3 του παρόντος, η Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, στην περίπτωση επιβεβαίωσης της εμφάνισης, κοινοποιεί αμέσως στο(-α) ενδιαφερόμενο(-α) κράτος(-η) μέλος(-η), όταν υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης καταχωρισμένου φυτικού υλικού από άλλο(-α) κράτος(-η) μέλος(-η) ή εντός αυτού(-ών), τις πληροφορίες που απαιτούνται για τη συμμόρφωσή του με το άρθρο 5 παράγραφος 3 του παρόντος, όπως:

α) την ονομασία της ποικιλίας της παρτίδας πατάτας ή τομάτας,

β) το ονοματεπώνυμο και τη διεύθυνση του αποστολέα και του παραλήπτη,

γ) την ημερομηνία παραλαβής της παρτίδας πατάτας ή τομάτας,

δ) το μέγεθος της παρτίδας πατάτας ή τομάτας που παραλήφθηκε,

ε) αντίγραφο του φυτοϋγειονομικού διαβατηρίου ή τουλάχιστον τον αριθμό του φυτοϋγειονομικού διαβατηρίου όπου χρειάζεται ή τον αριθμό μητρώου του καλλιεργητή ή εμπόρου όπου χρειάζεται και αντίγραφο του εμπορικού εγγράφου παράδοσης (π.χ. δελτίο αποστολής ή φορτωτική).

Η Επιτροπή πρέπει να ενημερώνεται αμέσως όταν έχει παρασχεθεί τέτοια πληροφόρηση.

4. Οι λεπτομέρειες της πρόσθετης κοινοποίησης που αναφέρεται στο άρθρο 5 παράγραφος 2 δεύτερο εδάφιο του παρόντος παρέχονται ως ακολούθως:

μετά την ολοκλήρωση όλων των ερευνών, για κάθε περίπτωση:

α) την ημερομηνία που επιβεβαιώθηκε η μόλυνση,

β) σύντομη περιγραφή της έρευνας που έλαβε χώρα για την ταυτοποίηση της πηγής και την ενδεχόμενη επέκταση της μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένου του επιπέδου της δειγματοληψίας που πραγματοποιήθηκε,

γ) πληροφορίες σχετικά με την(-ις) ταυτοποιημένη(-ες) ή πιθανή(-ές) πηγή(-ές) μόλυνσης,

δ) λεπτομέρειες σχετικά με την έκταση της προσδιορισθείσας μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού χώρων παραγωγής και για πατάτες τον αριθμό παρτίδων με ένδειξη της ποικιλίας και, στην περίπτωση πατατόσπορου, της κατηγορίας,

ε) λεπτομέρειες της οριοθέτησης ζώνης, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των περιοχών παραγωγής, που δεν έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένες, αλλά συμπεριλαμβάνονται στη ζώνη,

στ) λεπτομέρειες σχετικά με το χαρακτηρισμό των υδάτων, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ονομασία και η τοποθεσία της υδάτινης μάζας και η έκταση του χαρακτηρισμού /της απαγόρευσης άρδευσης,

ζ) για κάθε αποστολή φυτών ή παρτίδα τομάτας που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένη, τα πιστοποιητικά που ορίζονται στο άρθρο 15 παράγραφος 1 σημείο ii) του Π.Δ. 365/2000 (Α΄ 307) όπως αντικαταστάθηκε από το άρθρο 2 παράγραφος 8α) του Π.Δ. 179/2005 (Α΄ 229) και τον αριθμό διαβατηρίου, σύμφωνα με τον κατάλογο του παραρτήματος V, μέρος A, κεφάλαιο I σημείο 2.2 του Π.Δ. 365/2000 (Α΄ 307) όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει,

η) οποιαδήποτε άλλη πληροφορία σχετική με την(-τις) επιβεβαιωμένη(-μένες) εμφάνιση(-νήσεις) του εν λόγω επιβλαβούς οργανισμού, που απαιτεί η Επιτροπή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

1. Οι διατάξεις που αναφέρονται στο άρθρο 6 παράγραφος 1 του παρόντος, είναι οι εξής:

- χρήση ως ζωοτροφή ύστερα από θερμική επεξεργασία ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιβίωσης του οργανισμού,

ή

- διάθεση σε επισήμως εγκεκριμένη ειδική τοποθεσία διάθεσης αποβλήτων στην οποία δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος διαφυγής του οργανισμού στο περιβάλλον, μέσω π.χ. διήθησης σε γεωργικά εδάφη ή επαφής με πηγές νερού που μπορούν να χρησιμοποιούνται για άρδευση γεωργικών εδαφών

ή

- καύση,

ή

- βιομηχανική μεταποίηση μέσω απευθείας και άμεσης παράδοσης σε μεταποιητική μονάδα με επισήμως εγκεκριμένες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων για τις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού και με σύστημα καθαρισμού και απολύμανσης τουλάχιστον των αναχωρούντων οχημάτων,

ή

- άλλα μέτρα, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού· τα μέτρα αυτά και η αιτιολόγησή τους κοινοποιούνται αμέσως στην Επιτροπή και στις αρμόδιες αρχές των άλλων κρατών μελών από τη Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

Όλα τα εναπομείναντα απόβλητα που σχετίζονται και προκύπτουν από τις ανωτέρω επιλογές διατίθενται με επισήμως εγκεκριμένες μεθόδους σύμφωνα με το παράρτημα VII του παρόντος διατάγματος.

2. Η κατάλληλη χρήση ή διάθεση του καταχωρισμένου φυτικού υλικού που αναφέρεται στο άρθρο 6 παράγραφος 2 του παρόντος, υπό τον έλεγχο των αρμοδίων αρχών με την κατάλληλη επικοινωνία μεταξύ τους ώστε να εξασφαλίζεται πάντοτε ο έλεγχος αυτός και με την έγκριση τους στην περίπτωση που συσκευάζονται ή μεταποιούνται οι πατάτες όσον αφορά τις εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων που αναφέρονται στην πρώτη και τη δεύτερη περίπτωση, είναι η ακόλουθη:

i) για κονδύλους πατάτας,

- χρήση ως πατάτες εμπορίου (ware) με προορισμό την κατανάλωση, συσκευασμένες για άμεση παράδοση και χρήση χωρίς επανασυσκευασία, σε χώρο με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων. Οι πατάτες που προορίζονται για φύτευση μπορούν να υποβληθούν σε χερισμό στον ίδιο χώρο μόνον, εάν ο χειρισμός αυτός γίνει χωριστά ή μετά από καθαρισμό και απολύμανση,

ή

- χρήση ως πατάτες εμπορίου (ware) προοριζόμενες για βιομηχανική μεταποίηση, και που προορίζονται για απευθείας και άμεση παράδοση σε μεταποιητική μονάδα με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων και με σύστημα καθαρισμού και απολύμανσης τουλάχιστον των αναχωρούντων οχημάτων,

ή

- άλλη χρήση ή διάθεση, με την προϋποθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού και υπό την προϋπόθεση της έγκρισης από τις επίσημες αρχές,

ii) για άλλα μέρη φυτών, συμπεριλαμβανομένων υπολειμμάτων βλαστών και φυλλώματος,

- καταστροφή

ή

- άλλη χρήση ή διάθεση, με την προϋποθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού και υπό την προϋπόθεση της χορήγησης έγκρισης από τις αρμόδιες επίσημες αρχές.

3. Οι κατάλληλες μέθοδοι απολύμανσης των αντικειμένων που αναφέρονται στο άρθρο 6 παράγραφος 3 του παρόντος πρέπει να είναι ο καθαρισμός και, κατά περίπτωση, η απολύμανση, έτσι ώστε να μην υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού και πρέπει να εφαρμόζονται υπό την εποπτεία των αρμόδιων επισήμων αρχών.

4. Η σειρά μέτρων που εφαρμόζουν οι αρμόδιες αρχές εντός των οριοθετημένων ζωνών που καθορίστηκαν σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο iv) και στοιχείο γ) σημείο iii) και αναφέρονται στο άρθρο 6 παράγραφος 4, του παρόντος περιλαμβάνει:

4.1. Σε περιπτώσεις όπου οι περιοχές παραγωγής χαρακτηρίζονται ως μολυσμένες βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο ii) του παρόντος:

α) σε αγρό ή μονάδα με προστατευμένες καλλιέργειες που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένες βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο ii) του παρόντος είτε

i) κατά τη διάρκεια τουλάχιστον τεσσάρων καλλιεργητικών ετών μετά το έτος της προσδιορισθείσας μόλυνσης,

- λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και τομάτας και άλλων ξενιστών του οργανισμού συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανωδών

και

- δεν φυτεύονται τα ακόλουθα:
- κόνδυλοι, φυτά ή πραγματικοί σπόροι πατάτας,
- φυτά και σπόροι τομάτας,
- λαμβάνοντας υπόψη τη βιολογία του οργανισμού,
- άλλα φυτά ξενιστές,
- φυτά, είδη του γένους Brassica, στα οποία υπάρχει εμφανής κίνδυνος επιβίωσης του οργανισμού,
- καλλιέργειες στις οποίες υπάρχει εμφανής κίνδυνος εξάπλωσης του οργανισμού,
- κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση, και υπό την προϋπόθεση ότι ο αγρός έχει βρεθεί ότι είναι απαλλαγμένος από αυτοφυή φυτά τομάτας και πατάτας και άλλα φυτά ξενιστές συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανωδών, κατά τη διάρκεια επίσημων επιθεωρήσεων για δύο τουλάχιστον συνεχή καλλιεργητικά έτη πριν τη φύτευση,
- στην περίπτωση της πατάτας, επιτρέπεται μόνον η παραγωγή πατάτας εμπορίου (ware),
- στην περίπτωση πατάτας και τομάτας, οι συγκομισθέντες κόνδυλοι πατάτας ή τα φυτά τομάτας, ανάλογα, εξετάζονται, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο παράρτημα II,
- κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση και σύμφωνα με ένα κατάλληλο σύστημα αμειψισποράς τουλάχιστον δύο ετών εάν πρόκειται να καλλιεργηθεί πατατόσπορος, πραγματοποιείται επίσημη επιθεώρηση όπως καθορίζεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 του παρόντος,

ή

ii) κατά τη διάρκεια πέντε καλλιεργητικών ετών μετά την περίοδο της προσδιορισθείσας μόλυνσης,

- λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και τομάτας και άλλων ξενιστών του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανωδών,

και

- ο αγρός διατηρείται, κατά τα πρώτα τρία έτη, είτε χέρσος είτε με σιτηρά, ανάλογα με τον προσδιορισθέντα κίνδυνο, είτε ως μόνιμος βοσκότοπος στον οποίο η βλάστηση κόβεται συχνά και χαμηλά ή ο οποίος χρησιμοποιείται για εντατική βόσκηση ή με γρασίδι για σποροπαραγωγή·κατά τα επόμενα δύο έτη φυτεύονται φυτά που δεν είναι ξενιστές του οργανισμού για τα οποία δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος επιβίωσης ή διάδοσης του οργανισμού,
- κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας ή τομάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση, και υπό την προϋπόθεση ότι ο αγρός είναι απαλλαγμένος από αυτοφυή φυτά τομάτας και πατάτας και άλλα φυτά ξενιστές συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων της οικογένειας των σολανωδών, πρέπει για δύο τουλάχιστον συνεχή καλλιεργητικά έτη πριν τη φύτευση,
- στην περίπτωση της πατάτας, επιτρέπεται η παραγωγή πατατόσπορου ή πατάτας εμπορίου (ware),
- οι συγκομισθέντες κόνδυλοι πατάτας ή τα φυτά τομάτας, ανάλογα, εξετάζονται, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο παράρτημα II·

β) σε όλους τους άλλους αγρούς της μολυσμένης περιοχής παραγωγής και εφόσον οι αρμόδιες υπηρεσίες κρίνουν ότι έχει εξαλειφθεί ο κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού από αυτοφυή φυτά πατάτας ή τομάτας ή άλλα αυτοφυή φυτά που βρέθηκαν να είναι ξενιστές του οργανισμού συμπεριλαμβανομένων των σολανωδών ζιζανίων ανάλογα:

- το καλλιεργητικό έτος μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση:
- είτε δεν φυτεύονται κόνδυλοι, φυτά ή πραγματικοί σπόροι πατάτας ή άλλα φυτά που είναι ξενιστές του οργανισμού,

ή

- στην περίπτωση των κονδύλων πατάτας, είναι δυνατόν να φυτευθεί πιστοποιημένος πατατόσπορος για παραγωγή πατάτας εμπορίου (ware) μόνον,

- στην περίπτωση των φυτών τομάτας, είναι δυνατόν να φυτευθούν φυτά τομάτας που καλλιεργούνται από σπόρο που πληροί τις απαιτήσεις του π.δ. 365/2000 (Α΄ 307) όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει, για παραγωγή καρπών μόνον,

- το δεύτερο καλλιεργητικό έτος μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση:

- στην περίπτωση της πατάτας, για παραγωγή πατατόσπορου ή πατάτας εμπορίου (ware), φυτεύεται μόνον πιστοποιημένος πατατόσπορος ή πατατόσπορος που έχει υποβληθεί σε επίσημο έλεγχο για την απουσία της καστανής σήψης και έχει καλλιεργηθεί υπό επίσημο έλεγχο σε διαφορετικούς χώρους παραγωγής από αυτούς που αναφέρονται στο σημείο 4.1,

- στην περίπτωση της τομάτας, για παραγωγή φυτών ή καρπών, φυτεύονται μόνον φυτά τομάτας που καλλιεργούνται από σπόρο που πληροί τις απαιτήσεις του π.δ. 365/2000 (Α΄307) όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει ή, στην περίπτωση καλλιεργειών που πολλαπλασιάζονται βλαστητικά, από φυτά τομάτας που παράγονται από τέτοιου είδους σπόρο και καλλιεργούνται υπό επίσημο έλεγχο σε τόπους παραγωγής εκτός από αυτούς που αναφέρονται στο σημείο 4.1,

- τουλάχιστον για το τρίτο καλλιεργητικό έτος μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση,

- στην περίπτωση της πατάτας, φυτεύεται μόνον πιστοποιημένος πατατόσπορος ή πατατόσπορος που έχει παραχθεί υπό επίσημο έλεγχο από πιστοποιημένο πατατόσπορο για παραγωγή είτε πατατόσπορου είτε πατάτας εμπορίου (ware),

- στην περίπτωση της τομάτας, φυτεύονται για παραγωγή φυτών ή καρπών μόνον φυτά τομάτας που καλλιεργούνται από σπόρο που πληροί τις απαιτήσεις του π.δ. 365/2000 (Α΄ 307) όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει ή φυτά τομάτας που καλλιεγούνται υπό επίσημο έλεγχο και από τέτοιου είδους φυτά·

- κατά τη διάρκεια όλων των καλλιεργητικών ετών που αναφέρονται στις προηγούμενες περιπτώσεις, λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και άλλων αυτοφυών φυτών που βρέθηκαν να είναι ξενιστές του οργανισμού, εάν υπάρχουν, και διενεργείται επίσημος έλεγχος των καλλιεργούμενων φυτών σε κατάλληλες χρονικές περιόδους και, σε κάθε αγρό καλλιέργειας πατάτας, διενεργείται επίσημος έλεγχος όσον αφορά τις συγκομισθείσες πατάτες σύμφωνα με τη διαδικασία του παραρτήματος ΙΙ·

γ) αμέσως μετά το χαρακτηρισμό μόλυνσης σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο ii) του παρόντος και μετά το πρώτο επόμενο καλλιεργητικό έτος:

- καθαρίζονται και, κατά περίπτωση, απολυμαίνονται κατάλληλα όλα τα μηχανήματα και οι αποθηκευτικοί χώροι του τόπου παραγωγής που έχουν σχέση με την παραγωγή πατάτας και τομάτας, με τις κατάλληλες μεθόδους, όπως ορίζεται στο σημείο 3,

- εφαρμόζονται επίσημοι έλεγχοι των προγραμμάτων άρδευσης και ψεκασμού από τις αρμόδιες υπηρεσίες, συμπεριλαμβανομένης της απαγόρευσης αυτών, όπου ενδείκνυται, προκειμένου να παρεμποδιστεί η διάδοση του οργανισμού·

δ) στις μονάδες προστατευμένης παραγωγής που έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένες, βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο ii) του παρόντος όπου είναι δυνατή η πλήρης αντικατάσταση του υποστρώματος βλάστησης,

- δεν φυτεύονται κόνδυλοι, φυτά ή πραγματικοί σπόροι πατάτας ή άλλοι ξενιστές του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των φυτών και σπόρων τομάτας, παρά μόνο εάν στη μονάδα παραγωγής εφαρμόζονται επισήμως εποπτευόμενα μέτρα για την εξάλειψη του οργανισμού και την απομάκρυνση του υλικού όλων των ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων, τουλάχιστον, της πλήρους αντικατάστασης του υποστρώματος βλάστησης και του καθαρισμού και, κατά περίπτωση, της απολύμανσης της μονάδας παραγωγής και όλου του εξοπλισμού, και, στη συνέχεια έχει χορηγηθεί άδεια για παραγωγή πατάτας ή τομάτας από τις αρμόδιες αρχές,

και

- για παραγωγή πατάτας, η παραγωγή αυτή γίνεται από πιστοποιημένο πατατόσπορο ή από μικροκονδύλους ή μικροφυτά που προέρχονται από ελεγμένες πηγές,

- για παραγωγή τομάτας,η παραγωγή αυτή γίνεται από σπόρο που πληροί τις απαιτήσεις του Π.Δ. 365/2000 (Α΄ 307) όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει ή, στην περίπτωση καλλιεργειών που πολλαπλασιάζονται βλαστητικά, από φυτά τομάτας που παράγονται από τέτοιου είδους σπόρο και καλλιεργούνται υπό επίσημο έλεγχο,

- εφαρμόζονται κατάλληλοι επίσημοι έλεγχοι των προγραμμάτων άρδευσης και ψεκασμού, συμπεριλαμβανομένης της απαγόρευσης αυτών, προκειμένου να αποφευχθεί η διάδοση του οργανισμού·

4.2. Εντός της οριοθετημένης ζώνης, με την επιφύλαξη των μέτρων που περιγράφονται στο σημείο 4.1, οι αρμόδιες επίσημες αρχές με ελέγχους που διενεργούν:

α) αμέσως μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση, εξασφαλίζεται ότι καθαρίζονται και απολυμαίνονται κατάλληλα όλα τα μηχανήματα και οι αποθηκευτικοί χώροι σε τέτοιες εγκαταστάσεις που εμπλέκονται στην παραγωγή πατάτας ή τομάτας, με τις κατάλληλες μεθόδους όπως ορίζεται στο σημείο 3·

β) αμέσως, και για τρεις τουλάχιστον καλλιεργητικές περιόδους μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση:

βα) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες η οριοθετημένη ζώνη έχει προσδιοριστεί βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο iv) του παρόντος,

- διασφαλίζουν την εποπτεία των χώρων όπου καλλιεργούνται, αποθηκεύονται ή διακινούνται κόνδυλοι πατάτας ή τομάτες, καθώς και των χώρων στους οποίους λειτουργούν, βάσει σύμβασης, μηχανήματα για την παραγωγή πατάτας ή τομάτας,

- απαιτούν τη φύτευση αποκλειστικά πιστοποιημένου πατατόσπορου ή πατατόσπορου που έχει παραχθεί υπό επίσημο έλεγχο για όλες τις καλλιέργειες πατάτας της ζώνης αυτής, και δοκιμή, μετά τη συγκομιδή, του πατατόσπορου που παράγεται σε τόπους παραγωγής που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένοι, σύμφωνα με το άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχείο α) σημείο iii) του παρόντος,

- απαιτούν τη χωριστή διαχείριση των αποθεμάτων συγκομισθέντος πατατόσπορου και πατάτας εμπορίου για όλες τις εγκαταστάσεις της ζώνης ή ένα σύστημα καθαρισμού και, όπου ενδείκνυται, απολύμανσης που θα πρέπει να εφαρμοσθεί μεταξύ της διαχείρισης των αποθεμάτων πατατόσπορου και πατάτας εμπορίου (ware),

- απαιτούν τη φύτευση μόνον φυτών τομάτας που αναπτύσσονται από σπόρο που πληροί τις απαιτήσεις του Π.Δ. 365/2000 (Α΄ 307) όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει ή, στην περίπτωση καλλιεργειών που πολλαπλασιάζονται βλαστητικά, από φυτά τομάτας που παράγονται από τέτοιου είδους σπόρο και καλλιεργούνται υπό επίσημο έλεγχο, για όλες τις καλλιέργειες τομάτας της ζώνης αυτής,

- διενεργούν επίσημη επισκόπηση (survey), όπως περιγράφεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 του παρόντος,

ββ) στις περιπτώσεις κατά τις οποίες το επιφανειακό νερό έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο βάσει του άρθρου 5 παράγραφος 1 στοιχείο γ) σημείο ii) του παρόντος ή περιλαμβάνεται στα στοιχεία για πιθανή δι-

άδοση του οργανισμού, σύμφωνα με το παράρτημα V σημείο 2 του παρόντος διατάγματος,

- διενεργείται ετήσια επισκόπηση (survey) την κατάλληλη στιγμή, συμπεριλαμβανομένης της δειγματοληψίας του επιφανειακού νερού και, ενδεχομένως, των κατάλληλων ξενιστών της οικογένειας των σολανωδών στις σχετικές πηγές επιφανειακού νερού, και δοκιμές σύμφωνα με τις σχετικές μεθόδους που περιγράφονται στο παράρτημα II για το αναφερόμενο φυτικό υλικό και άλλες περιπτώσεις,

- εφαρμόζονται επίσημοι έλεγχοι στα προγράμματα άρδευσης και ψεκασμού, συμπεριλαμβανομένης της απαγόρευσης χρήσης του νερού που έχει χαρακτηρισθεί ως μολυσμένο για την άρδευση και τον ψεκασμό του καταχωρισμένου φυτικού υλικού, και, κατά περίπτωση, άλλων ξενιστών προκειμένου να αποφευχθεί η διάδοση του οργανισμού. Η απαγόρευση αυτή μπορεί να επανεξετάζεται βάσει των αποτελεσμάτων της προαναφερόμενης ετήσιας επισκόπησης (survey) και οι χαρακτηρισμοί ανακαλούνται στις περιπτώσεις που οι αρμόδιες επίσημες αρχές θεωρούν ότι το επιφανειακό νερό δεν είναι πλέον μολυσμένο. Είναι δυνατόν να επιτραπεί η χρήση νερού που τελεί υπό απαγόρευση, υπό την προϋπόθεση επίσημου ελέγχου, για άρδευση και ψεκασμό των φυτών ξενιστών, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται επισήμως εγκεκριμένες τεχνικές για την εξάλειψη του οργανισμού και την πρόληψη της μετάδοσής του,

- στις περιπτώσεις κατά τις οποίες οι απορρίψεις υγρών αποβλήτων είναι μολυσμένες, εφαρμόζονται επίσημοι έλεγχοι για τη διάθεση των στερεών αποβλήτων ή των απορρίψεων υγρών αποβλήτων από εγκαταστάσεις βιομηχανικής μεταποίησης ή συσκευασίας του αναφερόμενου φυτικού υλικού·

(γ) καταρτίζεται, όπου ενδείκνυται, πρόγραμμα αντικατάστασης όλων των αποθεμάτων πατατόσπορου σε εύθετο χρονικό διάστημα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

Οι επίσημα εγκεκριμένες μέθοδοι διάθεσης αποβλήτων που αναφέρονται στο παράρτημα VI παράγραφος 1 του παρόντος διατάγματος είναι σύμφωνες με τις ακόλουθες διατάξεις έτσι ώστε να αποτραπεί οιοσδήποτε εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού:

i) τα απόβλητα πατάτας και τομάτας (συμπεριλαμβανομένων των απορρίψεων πατατών και του φλοιού πατάτας) και οποιοδήποτε άλλο στερεό απόβλητο που προέρχεται από πατάτες και τομάτες (συμπεριλαμβανομένου του χώματος, των πετρών και άλλων υπολειμμάτων) πρέπει να απομακρύνονται, με :

- διάθεση σε επισήμως εγκεκριμένο και ειδικό χώρο διάθεσης αποβλήτων όπου δεν υφίσταται εμφανής κίνδυνος διαφυγής του οργανισμού στο περιβάλλον, π.χ. μέσω της διήθησης σε γεωργικά εδάφη ή της επαφής με πηγές υδάτων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για άρδευση γεωργικών εδαφών. Τα απόβλητα μεταφέρονται απευθείας στον εν λόγω χώρο υπό συνθήκες περιορισμού, έτσι ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος απώλειας των αποβλήτων,

ή

- καύση,

ή

- άλλα μέτρα, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού· τα μέτρα αυτά πρέπει να κοινοποιούνται από τη Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στην Επιτροπή και τα άλλα κράτη μέλη.

ii) υγρά απόβλητα: πριν από τη διάθεσή τους, τα υγρά απόβλητα που περιλαμβάνουν αιωρούμενα στερεά στοιχεία υποβάλλονται σε διαδικασίες διήθησης ή καθίζησης για την απομάκρυνση αυτών των στερεών στοιχείων. Η διάθεση των στερεών αυτών στοιχείων γίνεται με τους τρόπους που προβλέπονται στο σημείο i).

Τα υγρά απόβλητα πρέπει είτε:

- να θερμαίνονται τουλάχιστον σε 60 ΊC καθ' όλο τον όγκο επί τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από τη διάθεσή τους

ή

- να διατίθενται με άλλο τρόπο που έχει εγκριθεί επισήμως και υπό επίσημο έλεγχο, ώστε να μην υπάρχει εμφανής κίνδυνος επαφής των αποβλήτων με γεωργικά εδάφη ή πηγές νερού που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για άρδευση γεωργικών εδαφών. Οι λεπτομέρειες των μέτρων αυτών κοινοποιούνται από τη Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στα άλλα κράτη μέλη και την Επιτροπή.

Οι επιλογές που παρατίθενται στο παρόν παράρτημα ισχύουν επίσης για τα απόβλητα που έχουν σχέση με τη διαχείριση, διάθεση και επεξεργασία μολυσμένων παρτίδων.»

Άρθρο 3

Μετά το άρθρο 10 του π.δ. 255/2000 (Α΄ 214) προστίθενται νέο άρθρο 10α που έχει ως εξής :

«Άρθρο 10α
Εξουσιοδότηση

Με Απόφαση του Υπουργού Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων που δημοσιεύεται στην Εφημερίδα της Κυβερνήσεως, μετά από εισήγηση της Διεύθυνσης Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, μπορούν να ρυθμίζονται ειδικά και τεχνικά θέματα καθώς και κάθε λεπτομέρεια για την εφαρμογή του παρόντος διατάγματος, συμπεριλαμβανομένων και των παραρτημάτων αυτού.»

Άρθρο 4
(άρθρο 2 Οδηγίας 2006 / 63 /ΕΚ)
Έναρξη ισχύος

Το παρόν Προεδρικό Διάταγμα ισχύει από την 1η Απριλίου 2007.

Στον Υφυπουργό Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων αναθέτουμε τη δημοσίευση και εκτέλεση του παρόντος διατάγματος.

Αθήνα, 11 Ιουνίου 2007

Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ
ΚΑΡΟΛΟΣ ΓΡ. ΠΑΠΟΥΛΙΑΣ

ΟΙ ΥΠΟΥΡΓΟΙ

ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΩΝ
Γ. ΑΛΟΓΟΣΚΟΥΦΗΣ

ΥΦΥΠΟΥΡΓΟΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
Α. ΚΟΝΤΟΣ



ΑΠΟ ΤΟ ΕΘΝΙΚΟ ΤΥΠΟΓΡΑΦΕΙΟ
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΟΥ 34 * ΑΘΗΝΑ 104 32 * ΤΗΛ. 210 52 79 000 * FAX 210 52 21 004
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: http://www.et.gr – e-mail: webmaster.et@et.gr